

Evaluación del efecto genotóxico producido por exposición *in vivo* a pesticidas y mezclas en *Caiman latirostris*, evidenciado por el ensayo cometa

Romito, M.L.¹; López González, E.^{1,2}; Moleón, M.S.^{1,2}; Siroski, P.^{1,2,3}; Poletta, G.^{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. ³ Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina. ⁴ Cát. Toxicol. y Bioq. Legal, FBCB-UNL. Ciudad Universitaria - Paraje El Pozo S/N (3000), Santa Fe, Argentina. marialauraromito@yahoo.com.ar

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. Directora: Dra. Gisela Poletta.

Las actividades humanas generan una continua descarga de agroquímicos en el medio ambiente, principalmente asociados a cultivos transgénicos, independientemente de su persistencia, bioacumulación y toxicidad. *Caiman latirostris* (yacaré overo) es un importante representante de los humedales del noreste argentino, región que se caracteriza por una gran actividad agrícola en nuestro país. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial efecto genotóxico de diferentes pesticidas y mezclas ampliamente utilizados en agricultura sobre juveniles de *C. latirostris*, utilizando el ensayo cometa (EC).

Se utilizaron 132 animales pertenecientes a seis nidos recolectados en el marco de las actividades de rancheo del Proyecto Yacaré (Gob. de Santa Fe/MUPCN) y se distribuyeron en 11 grupos experimentales -GE- (12 animales por GE en dos réplicas de 6 cada uno): un control negativo (CN) tratado con agua destilada, un control vehículo (CV) tratado con etanol, dos grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfan (END1 y END2), dos expuestos a formulación de Cipermetrina (CIP1 y CIP2), dos expuestos a formulación de glifosato Roundup® Full II (RU1 y RU2), dos expuestos a formulación de glifosato PANZER GOLD® (PANZ1 y PANZ2) y un grupo expuesto a la mezcla (M) de tres formulaciones a la concentración más baja: END1 + CIP1 + RU1.

Se llevó a cabo una exposición sub-crónica por inmersión, durante dos meses, en bateas plásticas inclinadas para proveer una superficie seca y una superficie con agua, donde se colocaron los plaguicidas disminuyendo las concentraciones progresivamente en el tiempo, para simular la degradación de los compuestos en agua, previamente determinada por cromatografía gaseosa en el caso de END y CIP y por HPLC para glifosato⁴. Las concentraciones iniciales y finales para los tratamientos 1 y 2 de CIP y END estuvieron en los rangos 0,5µL-0,05µL y 1µL-0,01µL, respectivamente. En cuanto a las formulaciones de glifosato, las concentraciones iniciales y finales para los tratamientos 1 y 2 fueron de 2,5mg/L-0,25mg/L y de 5mg/L-0,5mg/L, respectivamente.

Los animales fueron medidos (LT: longitud total y LHC: longitud hocico-cloaca, precisión 0,5cm) y pesados (precisión 0,1g) al inicio y final de la experimentación para determinar el crecimiento en cada GE. Una vez finalizado el experimento se tomaron muestras de sangre (0,5ml) de la vena espinal de cada animal con jeringas estériles heparinizadas.

En todas las muestras de sangre se determinó la viabilidad celular y luego se aplicó el EC en eritrocitos de sangre periférica, por duplicado, según la técnica previamente adaptada para la especie². Las muestras fueron observadas en microscopio de fluorescencia a 400X y utilizando naranja de acridina como colorante. Se analizaron visualmente 100 células por animal (50 por cada réplica), y se clasificaron en cinco categorías arbitrarias de daño teniendo en cuenta longitud de la cola e intensidad de fluorescencia, desde la clase 0 (sin daño) hasta la clase 4 (máximo daño). Se calculó el índice de daño (ID) para cada muestra mediante la fórmula: $ID = n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4$, donde n_1 , n_2 , n_3 y n_4 es el número de células en las categorías de daño 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

La viabilidad celular de todas las muestras fue del 95-100% lo que indicó condiciones propicias para la aplicación del ensayo. Los resultados del EC demostraron que los pesticidas inducen un incremento significativo en el índice de daño en los animales expuestos a CIP 1 y 2, END 1 y 2 y RU 1 y 2, comparados con el CN ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los grupos expuestos a PANZ ni en la mezcla. Por otro lado, no se encontraron diferencias en el peso, LT y LHC en caimanes expuestos a los diferentes pesticidas y concentraciones.

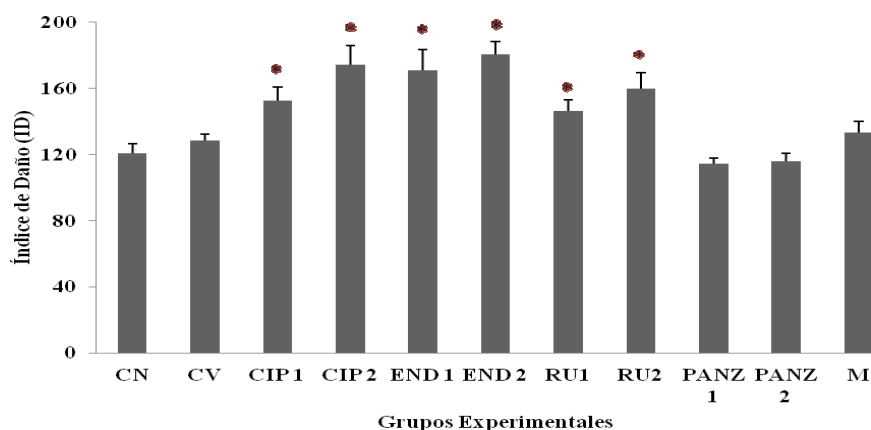


Fig. 1: Índice de Daño (ID) en juveniles de *Caiman latirostris* expuestos a diferentes formulaciones comerciales de pesticidas y mezcla. CN: Control Negativo; CV: Control Vehículo; CIP1 y CIP2: formulación comercial de Cipermetrina; END1 y END2: formulación comercial de Endosulfán; RU1 y RU2: formulación comercial de glifosato Roundup® Full II; PANZ1 y PANZ2: formulación comercial de glifosato Panzer Gold®; M: mezcla de pesticidas RU1+END1+ CIP1. *Estadísticamente significativo respecto al CN.

Nuestros datos muestran claramente que cuando los caimanes son expuestos a concentraciones subletales y ambientalmente relevantes de plaguicidas ampliamente utilizados en las prácticas agrícolas de la región, se produce un incremento en el daño al ADN. Estos resultados concuerdan con otros trabajos realizados por nuestro grupo de investigación que revelan daños genotóxicos en *C. latirostris* en diferentes estadios del desarrollo^{1,2,3}. Esto podría traer cambios en el material genético afectando el normal desarrollo individual y de las poblaciones ambientalmente expuestas. La falta de efecto en la mezcla puede deberse a un efecto antagonista entre los compuestos, por lo que debe considerarse que el comportamiento de los compuestos en el ambiente dependerá de las propiedades químicas y modos de acción tóxica de los mismos, además de las características biológicas de la especie. Esta investigación sugiere una seria preocupación con respecto a los posibles peligros de la utilización desmedida de estos compuestos a nivel ambiental para la fauna silvestre asociada a esos ambientes. La utilización del EC es una herramienta eficaz para la detección temprana del daño genotóxico en organismos no blanco como *C. latirostris*, recurso ecológico y económico particularmente representativo de la región.

Bibliografía

¹López 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.

²Poletta 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.

³Poletta G.L.; Larriera A.; Kleinsorge, E.; Mudry, M.D. (2009). Genotoxicity of the herbicide formulation Roundups (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutat Res* 672:95-102.

⁴Poletta G.L.; Kleinsorge E.; Paonessa A.; Mudry M.D.; Larriera A.; Siroski P.A. (2011). Genetic enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicol Environ Safe* 74:852-859.