

Artículo original

## Inhibición de la respuesta linfocitaria a la fitohemaglutinina por el herbicida Roundup en el armadillo *Chaetophractus villosus*

### *Inhibition of lymphocyte response to phytohaemagglutinin by Roundup in the armadillo Chaetophractus villosus*

Luaces JP<sup>1,3</sup>, Rossi LF<sup>2,3</sup>, Saiz MY<sup>4</sup>, Contrera Prieto MJ<sup>4</sup>, Lopes de Souza ER<sup>4</sup>, Iodice OH<sup>3,4</sup>, Mudry MD<sup>5,6</sup>, Merani MS<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud (CAECIHS), Universidad Abierta Interamericana (UAI), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Cromosómica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. <sup>3</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). <sup>4</sup>Instituto de Fisiología y Neurociencias (IFiNe-SeCyT). Universidad de Morón. <sup>5</sup>Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Ecología, Genética y Evolución (DEGE). Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE). Intendente Güiraldes 2160, C.A.B.A. Pabellón II, 4to piso (C1428EGA) Buenos Aires, Argentina. <sup>6</sup>CONICET- Universidad de Buenos Aires. Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires. (IEGEB)

Manuscrito recibido: 3 de agosto de 2020; aceptado para publicación: 2 de noviembre de 2020

Autor de Contacto: Dr. Juan Pablo Luaces. Dirección Postal: Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud (CAECIHS), Universidad Abierta Interamericana (UAI), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; Av. Montes de Oca 745, 2º piso - (C1270AAH), CABA. E-mail: [juanpluaces@yahoo.com](mailto:juanpluaces@yahoo.com)

#### Resumen

Las especies animales cuya distribución natural se superpone con zonas agrícolas de Argentina intensamente expuestas a agroquímicos, cobran interés como posibles modelos experimentales para estudios de biomonitorio. En este contexto se utilizaron ejemplares del armadillo *Chaetophractus villosus* que fueran expuestos a Roundup (RU) para evaluar la respuesta linfocitaria a la fitohemaglutinina (PHA). Los ejemplares recibieron distintas concentraciones de Roundup® Full II (66,2% de glifosato) (0,026; 0,053; 0,106 o 0,379 mL de RU, grupos I a IV respectivamente) en forma oral diariamente por siete días. El potencial efecto de RU fue analizado en linfocitos de sangre periférica, luego de 72 h de cultivo, utilizando el índice blástico (IB) como biomarcador. Se tomaron muestras durante 30 días en cuatro momentos: T0 (día cero) (valor de control), T1 (24 hs posterior a la primera exposición), T7 (7 días) y T30 (30 días). Se observó un descenso significativo del IB en todos los grupos respecto del control al T1 ( $p < 0,05$ ). Transcurridos los siete días de exposición se observó una recuperación en el IB salvo para el grupo II (0,053 mL RU) cuya recuperación se observa al T30. Se observó una disminución de la respuesta linfocitaria a la PHA en individuos de *C. villosus* expuestos a RU. Se discute el valor del IB junto a otros biomarcadores de uso habitual y se confirma a *C. villosus* como especie centinela.

**Palabras clave:** mamíferos, especie centinela, índice blástico, biomonitorio

DOI: <http://doi.org/10.34073/225>

## Abstract

Animal species which natural environments are immersed in areas of intense agricultural activity represent an interesting field for biomonitoring studies. The effect of Roundup (RU) on lymphocyte response to phytohaemagglutinin (PHA) was analyzed using blastic index (BI) as biomarker after 72 h of culture. Adults animals of both sexes were exposed to Roundup® Full II (66,2% glifosate) (0,026; 0,053; 0,106 o 0,379 mL de RU, groups I to IV respectively) daily in oral treatment during 7 days. We analyzed RU effect for 30 days at different moments: T0 (day 0) (control value), T1 (24 h after the first exposition), T7 (7 days) and T30 (30 days). At T1, all groups exhibit a decrease in the BI with respect to control ( $p < 0.05$ ). At T7, the frequency increases for all concentrations except for group II (0.053 mL RU) ( $p < 0.05$ ). We observed a decrease in the BI biomarker in individuals of *Chaetophractus villosus* exposed to RU. We discuss our results of BI with other traditional biomarkers and we confirm *C. villosus* as sentinel species.

**Keywords:** mammal, sentinel species, blastic index, biomonitoring studies

## Introducción

La producción de desechos, productos de la actividad agropecuaria y el uso de agroquímicos se intensificaron en las últimas décadas (Pengue, 2005; Ronco *et al.*, 2016). Si bien se ha dicho que los pesticidas incrementan los rindes de la producción vegetal, es importante conocer sus efectos a nivel de los diferentes posibles protagonistas de su exposición así como en el ecosistema como un todo.

En un agroecosistema, las plantas, los animales y los humanos no sólo se encuentran expuestos al principio activo de los pesticidas sino a complejas formulaciones en las que interactúan componentes activos y excipientes (Mesnage *et al.*, 2014). Así surge la necesidad de estudiar el efecto de la exposición a mezclas complejas de plaguicidas y no a los mismos individualmente. En los herbicidas, se utilizan distintas formulaciones con base de glifosato (como componente activo), entre ellos, el Roundup® (RU) es el más ampliamente utilizado a escala mundial (Seralini *et al.*, 2013). El RU es una formulación compleja cuyo principio activo es el glifosato (N-fosfonometil-glicina) y que además posee polioxietilnamina (POEA) como surfactante.

Recientemente, el glifosato fue clasificado como probable carcinógeno por la Asociación Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (*International Agency for Research on Cancer* –IARC–, 2017). Sin embargo, en contraposición, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, 2016) concluyó que había suficiente y consistente evidencia que indicaba que era improbable que el glifosato fuera cancerígeno para humanos. En el año 2018 a partir de la adquisición de Monsanto por Bayer se comenzó una campaña de legitimación y la

consiguiente justificación del continuo uso de glifosato en cultivos intensivos de cereales a nivel local e internacional que incluyó la progresiva eliminación del nombre Monsanto de la empresa (Rebière y Mavoori, 2020).

Si bien la discusión acerca de la toxicidad del principio activo (glifosato) es aún objeto de debate, efectos secundarios fueron observados en formulaciones a base de glifosato (como RU): disrupción endócrina durante el embarazo y alteración en la producción de espermatozoides en especies animales (Clair *et al.*, 2012; Romano *et al.*, 2011) o bien, alteraciones en el ADN en linfocitos de sangre periférica en animales (Luaces *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2018) y en células humanas (Wozniak *et al.*, 2018).

De los diversos estudios publicados sobre toxicidad del glifosato cabe decir que aún no existe consenso acerca de la inmunotoxicidad en humanos (Corsini *et al.*, 2013). Recientemente, para una formulación de RU se describió la alteración de la homeostasis en una línea de células dendríticas humanas (Lindberg *et al.*, 2020). En animales silvestres, se observó el efecto inmunotóxico del RU y el glifosato en especies autóctonas como el yacaré (con biomarcadores de conteo de glóbulos blancos) (Latorre *et al.*, 2012) y en el lagarto overo (utilizando biomarcadores de recuento de leucocitos y actividad hemolítica del sistema del complemento) (Mestre *et al.*, 2019).

La respuesta linfocitaria a la fitohemagglutina (PHA) en humanos y animales expuestos a pesticidas, fue analizada a través de técnicas diversas (Lee *et al.*, 1979; Akiyama *et al.*, 1983; Lahvis *et al.*, 1995; Vine *et al.*, 2000; Thrasher *et al.*, 2002; Pistl *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2008; Castillo-Cadena *et al.*, 2013). En este contexto, el índice blástico

(IB) permite determinar la respuesta linfocitaria a la PHA mediante la clasificación morfológica de los linfocitos en cultivo en base al grado de condensación de la cromatina. Por tal característica fue utilizado como biomarcador de citotoxicidad, evaluando la estimulación de linfocitos a partir del análisis citológico del cultivo al microscopio óptico (Akiyama *et al.*, 1983; Gawron *et al.*, 1990). La estimulación de los linfocitos T por la PHA resulta de un complejo proceso donde la PHA se une a glucoproteínas de superficie como CD2, CD3 y al complejo TCR. Esta estimulación involucra tanto a los linfocitos T como a otros leucocitos (monocitos) y también a citoquinas específicas (Cooper y Pellis, 1998). Los pesticidas observados en su ámbito de uso a campo permanecen en parte en su zona de aplicación, y a su vez son transportados por difusión y por masas de aire. Este fenómeno de “deriva” desplaza el pesticida fuera de la zona blanco (Lupi *et al.*, 2019). En zonas cultivadas de la Provincia de Santa Fe (Argentina) se registraron en el suelo niveles máximos de glifosato (mayores a 4 mg/kg) posteriores a la aplicación del herbicida. En cambio, en el agua (en humedales lindantes a campos de la Provincia de Buenos Aires donde se aplicó el herbicida) los niveles de glifosato fueron entre 0,1 y 0,7 mg/L con máximos que fueron asociados a eventos de precipitación, debido a la capacidad del glifosato del suelo para solubilizarse en agua (Peruzzo *et al.*, 2008). La contaminación de fuentes de agua con agroquímicos fue evaluada en zonas de intensa actividad agrícola de las Provincias de Córdoba y Entre Ríos, donde se halló glifosato y sus residuos como contaminantes (Primost *et al.*, 2017; Bonansea *et al.*, 2018). De esta forma, las zonas inundadas de campos cultivados son una fuente de agua contaminada con agroquímicos principalmente durante los períodos de fumigación.

En ecosistemas donde especies introducidas, como el caso de los cultivos que son fumigados intensamente, se relacionan fauna y flora características, existen organismos que pueden ser más informativos que otros a fin de estudiar cómo los pesticidas pueden afectar estos ecosistemas. Un organismo centinela debe reunir ciertos criterios para ser considerado como tal. Entre ellos, los hábitos de vida bien caracterizados, una distribución ubicua, con relativa abundancia, fácil manipulación, larga expectativa de vida y tolerancia a la bioacumulación de sustancias tóxicas (Zhou *et al.*, 2008). Los estudios en una especie centinela o

biomonitor ambiental permiten identificar prematuramente los efectos adversos de diferentes agentes en los ambientes expuestos (LeBlanc y Bain, 1997). En este contexto cobra valor la identificación de especies centinela en las que se puedan analizar biomarcadores sensibles, de exposición o de efecto, a agentes que uno desea monitorear en determinados ambientes. Distintos grupos animales han sido propuestos como centinelas: en el ámbito silvestre, aves (George, 1999), mamíferos terrestres y marinos (Wells *et al.*, 2004; Basu *et al.*, 2007), reptiles (Schaumburg *et al.*, 2016; Poletta *et al.*, 2017; Siroski *et al.*, 2017), organismos acuáticos (De la Torre *et al.*, 2000; O’Conner, 2002) y por otro lado, también animales domésticos (Pastorinho y Souza, 2020). Dentro de los mamíferos, los armadillos (orden Xenarthra) constituyen un modelo adecuado para estudios de biomonitoreo ya que presentan larga expectativa de vida, son omnívoros, cavadores y exhiben reducida vagilidad (Rossi *et al.*, 2016). El peludo (*Chaetophractus villosus*) es una de las especies de armadillo más abundante en el agroecosistema de la región pampeana argentina. Esta especie es endémica de Sudamérica y su distribución geográfica natural se extiende a través de un amplio rango de ambientes (Abba *et al.*, 2010). En Argentina su distribución presenta una importante superposición con zonas cultivadas (Rossi *et al.*, 2018). En las últimas décadas se describió una expansión de las poblaciones de *C. villosus* favorecida por la transformación del sistema agrario (Abba *et al.*, 2015). *C. villosus* establece sus madrigueras en lotes cultivados motivo por el cual su exposición a agroquímicos es frecuente (Abba *et al.*, 2015). Entre los criterios que un organismo centinela debe reunir se considera la posibilidad de su manutención en condiciones de cautividad para ensayos *in vivo* de toxicología (Basu *et al.*, 2007). En *C. villosus* se establecieron condiciones de bioterio y de manutención (Iodice, 2010) que sustentan el uso de esta especie para evaluar el efecto de contaminantes tanto en condiciones controladas de laboratorio (*in situ*) como a campo (*ex situ*). Recientes estudios refieren al armadillo *C. villosus* como biomonitor ambiental (Rossi *et al.*, 2016; Luaces *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2018;). Entre estas publicaciones previas se ha descrito el efecto genotóxico *in vivo* por exposición al herbicida RU a partir de cultivos de linfocitos de ejemplares de ambos sexos (Rossi *et al.*, 2018). Frente a esto, distintos nuevos estudios permitirían continuar con la evaluación de biomarcadores

de interés para una caracterización más amplia del modelo de vida silvestre como organismo centinela. El objetivo del trabajo es determinar el IB para evaluar el efecto sobre la capacidad de respuesta linfocitaria a la PHA tras la exposición a RU de *C. villosus*.

## Material y Métodos

### Animales

Un total de 12 adultos (8 machos y 4 hembras) de *C. villosus* fueron capturados manualmente en Lucas Monteverde, Buenos Aires, Argentina (35°49'S, 59°98'W), dentro de su distribución geográfica natural durante abril de 2018 (Rossi *et al.*, 2016). Se los seleccionó de un área libre de cultivos y zonas urbanas para minimizar la exposición a contaminantes ambientales y en particular a pesticidas. Los animales se consideraron adultos con un peso superior a 3 kg, y en los ejemplares macho se confirmó la producción de espermatozoides como criterio de adultez.

Los especímenes fueron alojados en condiciones de bioterio 90 días previos al experimento en recintos circulares de plástico de 90 cm de diámetro por 80 cm de altura con viruta de madera blanda como material absorbente que fue cambiada dos veces por semana. Se utilizó luz artificial con un fotoperiodo controlado coincidente con la luz exterior vigente. Se administró alimento balanceado premium para caninos (con una composición mínima de 31% de proteína, 20% de grasa y 5% de fibra) *ad libitum* en forma diaria, al igual que agua potable sin contaminar como agua de bebida. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Morón, Buenos Aires, Argentina.

### Determinación del consumo de agua

El consumo de agua se determinó en un ejemplar hembra de *C. villosus* de 7 meses, nacido en condiciones de bioterio. Le fue suministrada la cantidad de 500 mL de agua de bebida luego de la ración de comida en un bebedero cuadrangular de vidrio con una profundidad de 6 cm y capacidad de hasta 600 mL. Se le permitió el acceso al agua durante 30 minutos, luego el volumen restante en el bebedero fue medido utilizando una probeta. Este proceso se realizó con una periodicidad semanal y el periodo de muestreo fue de un

año en un horario entre las 12 y 13 hs. Posteriormente a la determinación del consumo de agua (ver Resultados) para establecer las dosis de prueba en este diseño experimental, en base al consumo de agua diario del animal se realizaron las diluciones correspondientes a concentraciones de RU que contemplaron las concentraciones contaminantes de glifosato en agua registradas en zonas inundadas que limitan con campos de intensa aplicación de RU en la Provincia de Buenos Aires (Peruzzo *et al.*, 2008).

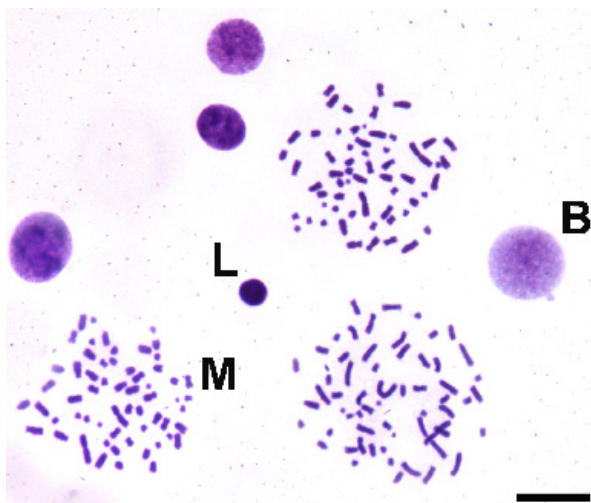
### Diseño experimental y tratamientos

En ejemplares de *C. villosus* en condiciones de ayuno se realizó una exposición al herbicida RU (Roundup® Full II (66,2% de glifosato) en diferentes concentraciones suministradas diariamente durante siete días y en forma oral utilizando una jeringa descartable. Los animales fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos (n=3, dos machos y una hembra cada grupo). Cada grupo experimental compartió el mismo recinto y bebedero. El grupo I recibió 0,026 mL de solución de RU, el grupo II recibió 0,053 mL de solución de RU, el grupo III recibió 0,106 mL de solución de RU y el grupo IV recibió 0,379 mL de solución de RU en forma oral diariamente. Las diluciones fueron realizadas en agua de bebida (véase también sección *Animales* al comienzo). Considerando un rango de peso de entre 3 y 3,5 kg para los animales en estudio la dosis fue de 0,0074-0,0087 mL/kg (grupo I), 0,0151-0,177 mL/kg (grupo II), 0,0303-0,0353 mL/kg (grupo III) y 0,1083-0,1263 mL/kg (grupo IV). De cada ejemplar en estudio se extrajeron 3 mL de sangre periférica de entre el primer y el segundo anillo de la cola (según Luaces *et al.*, 2011), de la *rete mirabile* de la arteria coccígea, a lo largo de 30 días en cuatro momentos: al día cero (T0, valor de control antes de la administración de RU), al día 1 (T1, transcurridas 24 h luego de la primera administración de RU), al día 7 (T7) y al día 30 (T30).

### Cultivo de linfocitos y determinación del IB

Se realizó cultivo de linfocitos de sangre periférica según Rossi *et al.* (2016) con las adecuaciones para la especie de estudio. Se cultivaron en 10 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (Gibco, Grand Island, NY, USA), suero fetal bovino al 10% (Bioser, Argentina), antibiótico (penicilina 250 U/mL y estreptomycin 250 mg/

mL, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) y fitohemaglutinina M (PHA, Sigma–Aldrich, 2% v/v). Se realizaron cultivos por duplicado que fueron incubados a 34 °C por 72 horas. Para contabilizar el IB, las células se clasificaron como linfocitos o linfoblastos en base a la condensación de su cromatina (**Fig. 1**). Aquellas células con cromatina condensada y dimensiones menores a 10  $\mu\text{m}$  fueron clasificadas como linfocitos mientras que las células de dimensiones mayores a 10  $\mu\text{m}$  y con la cromatina laxa fueron clasificadas como linfoblastos, las metafases se consideraron como linfoblastos ya que corresponden a los linfocitos que respondieron a la PHA (**Fig. 1**) (Akiyama et al., 1983). Se utilizó el software Leica Application Suite v. 3.6.0. cuando fue requerido realizar mediciones de células. Las determinaciones fueron realizadas en dos portaobjetos por individuo, se analizaron 200 células por portaobjeto contabilizando 400 células por individuo. El índice blástico resultó del porcentaje de linfoblastos sobre el total de células contadas. Los valores de IB para un portaobjeto analizado resultaron del promedio de IB obtenido por dos observadores independientes. Las células fueron visualizadas con un microscopio Leitz DMRB y fotografiadas con una cámara Leica DFC 300 FX digital camera (Leica Microsystems) y el software Leica Application Suite v. 3.6.0.



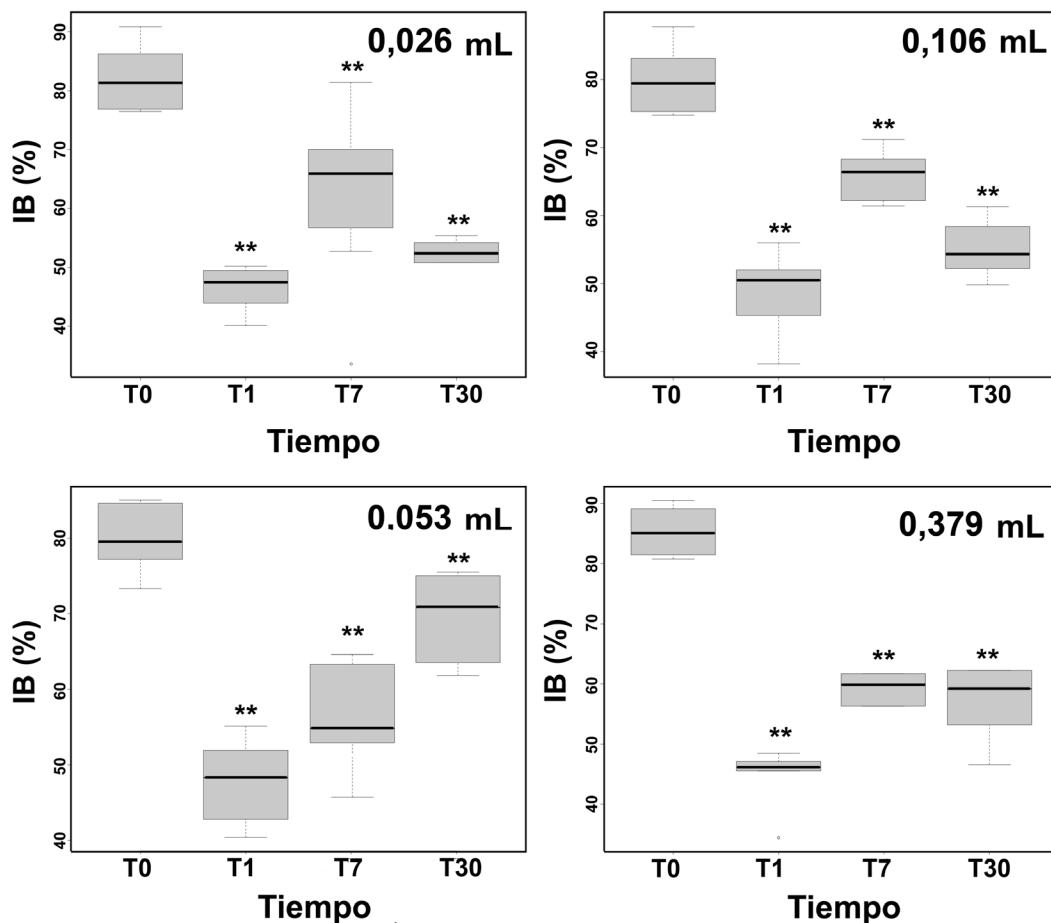
**Figura 1. Micrografía de cultivo de linfocitos de sangre periférica de *C. villosus*.** Se muestra un campo analizado donde se observan linfocitos (L) de cromatina condensada y no mayores a 10  $\mu\text{m}$ , linfoblastos (B) de cromatina laxa y mayores a 10  $\mu\text{m}$  y metafases (M). Tinción de Giemsa. Barra de escala 10  $\mu\text{m}$ .

### Análisis estadístico

Los datos para machos y hembras fueron analizados en conjunto ya que no se encontraron diferencias significativas entre sexos utilizando la prueba t de Student ( $p = 0,24$ ). Los datos de IB presentaron una distribución normal. No mostraron homocedasticidad y fueron analizados utilizando ANOVA de una vía (con una significancia de  $p < 0,05$ ), utilizando para las comparaciones múltiples la corrección de Bonferroni. Para realizar el análisis estadístico fue utilizado el software R studio Version 1.2.5042.

### Resultados

A fin de caracterizar los parámetros biológicos básicos de *C. villosus* en condiciones de bioterio, se determinó el consumo diario de agua de 57,50  $\pm$  5,92 mL (**Tabla I**, ver Anexo). El agua de bebida se consideró el eluyente natural del agente a evaluar, a partir del cual se realizaron las diluciones necesarias para la administración de RU. En condiciones de bioterio para *C. villosus* al T0 se obtuvieron valores basales de IB 81,83  $\pm$  4,02, siendo en machos de 82,71  $\pm$  4,42 y en las hembras de 80,06  $\pm$  2,72, los datos de IB fueron analizados en conjunto ya que no se observaron diferencias entre sexos ( $p = 0,24$ ). A las 24 h de la primera exposición a RU se observó un descenso significativo del IB en todos los grupos analizados (T1,  $p < 0,05$ ) (**Fig. 2**). Luego de una semana de exposición al RU al T7 se observó un incremento significativo del IB respecto del T1 para todas las dosis de prueba exceptuando el grupo II (0,053 mL RU) que sólo mostró una tendencia ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 2**). Transcurridos los 30 días, los valores de IB no recuperaron los niveles iniciales (determinados al T0) para ninguno de los cuatro grupos experimentales ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 2**). El IB mostró al T30 valores que oscilaron de acuerdo a la dosis respecto del T7 ( $p < 0,05$ ), en algunos casos menores (grupo I y III), mayores (grupo II) o invariables (grupo IV).



**Figura 2. Índice blástico (IB) en los diferentes grupos experimentales de *C. villosus*.** Animales expuestos al herbicida Roundup (RU) y cultivados durante 72 h. (\*\*) estadísticamente significativo respecto al control ( $p < 0,05$ ). El volumen utilizado (0,026, 0,053, 0,106 y 0,379 mL) se encuentra como mL de solución de herbicida (66,3% RU) debajo de cada gráfico. El efecto de RU fue evaluado al día cero (T0, valor de control antes de la administración de RU), al día 1 (T1, transcurridas 24 h luego de la primera exposición), al día 7 (T7) y al día 30 (T30).

### Discusión

En la literatura la respuesta a la PHA fue utilizada para evaluar la inmunotoxicidad de diferentes pesticidas y analizada con diversas técnicas: utilizando índice mitótico (IM) e incorporación de timidina tritiada en estudios *in situ* (Vine *et al.*, 2000; Castillo-Cadena *et al.*, 2013), mediante ensayo de migración linfocitaria utilizando endosulfán (Pistl *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2008), en ensayos de exposición a clorpirifos por la técnica de extendido MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Thrasher

*et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 2008) y con el DDT (dicloro difenil tricloroetano) utilizando incorporación de timidina tritiada (Lee *et al.*, 1979; Lahvis *et al.*, 1995). En estos estudios se observó un descenso de la respuesta a la PHA que sería concordante con los resultados obtenidos en el presente trabajo promoviendo la realización de nuevos estudios que analicen el efecto de los pesticidas sobre la respuesta linfocitaria con especial énfasis en el herbicida RU que, a la luz de este primer ensayo, en armadillos no sería un agente inocuo que está presente en grandes extensiones

de su distribución natural. En base a la determinación del consumo de agua para esta especie en condiciones de bioterio y los valores de glifosato obtenidos en estudios que analizaron los niveles del herbicida en humedales (luego de su aplicación en campos adyacentes) (Peruzzo *et al.*, 2008), se realizaron diluciones de RU representativas de los niveles de glifosato observadas en zonas inundadas que pudieran ser fuentes de agua de bebida para esta especie.

En trabajos previos en *C. villosus* hemos estudiado el efecto de RU utilizando distintos biomarcadores de genotoxicidad en conjunto con el biomarcador índice mitótico (IM) en cultivo de linfocitos con PHA *in vivo* e *in vitro* (Luaces *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2018). En el actual trabajo se analizó el efecto del herbicida RU sobre la respuesta linfocitaria frente a la PHA en ejemplares de *C. villosus* en condiciones de bioterio mediante otro biomarcador como es el IB con hallazgos que aportan nueva caracterización sobre el efecto no deseado del RU. Otros autores evaluaron la respuesta linfocitaria a la PHA, utilizando timidina tritiada en cultivo de linfocitos, frente a pesticidas en otras especies tales como delfines, observando una correlación inversa entre la concentración de DDT en sangre y la respuesta linfocitaria (Lahvis *et al.*, 1995) y en peces con una reducción del 55% de la respuesta linfocitaria frente a glifosato respecto de los controles (El-Gendy *et al.*, 1998). Nuestros resultados muestran una disminución del IB frente al pesticida RU que parecerían concordar con aquellos obtenidos en otras especies silvestres citados previamente ya que no siempre resultan comparables los diseños experimentales.

El biomarcador utilizado en este trabajo que es el IB evidencia el grado de estimulación de los linfocitos frente a la PHA (Vine *et al.*, 2000). Se hace evidente una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la respuesta a la PHA por exposición a RU en *C. villosus*. Los valores mínimos de IB fueron alcanzados a las 24 h de exposición. El incremento del IB al T7 respecto del T1 podría indicar una recuperación de la respuesta linfocitaria luego de 7 días. Transcurridos los 30 días de exposición los valores de IB no alcanzaron los valores iniciales al T0, lo cual muestra una ausencia de recuperación transcurridos los 30 días de la primera exposición a RU. En el presente diseño experimental se midió el efecto del RU en plasma a las 24 h de su administración por vía oral. De acuerdo a lo establecido en ratas la toxicocinética del glifosato

determinada a diferentes intervalos luego su administración por vía oral tiene un pico en plasma a las 5 h y una vida media de eliminación a las 15 h (Anadón *et al.*, 2009). Por lo que una menor concentración de glifosato es la que podría afectar la respuesta linfocitaria a la PHA utilizando cultivos de 72 h, como es el caso del presente diseño experimental. En esta especie se disponen de limitados estudios sobre fisiología y metabolismo y resulta necesario ampliar el conocimiento con datos necesarios para investigaciones destinadas a diversas disciplinas.

La respuesta linfocitaria a la PHA fue utilizada como biomarcador en distintas oportunidades ya referidas precedentemente (Vine *et al.*, 2000; Pistl *et al.*, 2003). En esta nueva contribución utilizamos la evaluación morfológica como criterio de activación linfocitaria. Este tipo de evaluación constituye un ensayo de rutina en los laboratorios donde se realiza cultivo de linfocitos con las más diversas aplicaciones y diferentes evaluaciones por microscopía. Así, el diagnóstico citológico como parte de una batería de ensayos aplicando distintos biomarcadores se presenta como una herramienta valiosa dada su practicidad y bajo costo.

En el marco de un estudio de caracterización de efecto es sabido que se debe aplicar una batería de ensayos o analizar un grupo de biomarcadores. En este contexto cobra otro valor el estudio del IB como dato básico para analizar el comportamiento de distintos indicadores a nivel linfocitario. Si consideramos otros biomarcadores de respuesta linfocitaria a la PHA como el índice mitótico (IM) previamente publicado en esta especie, se observa que el IM sólo disminuye para la dosis más concentrada y al T1 (0,379 mL) (Rossi *et al.*, 2018). Al comparar el IM con el biomarcador IB analizado en este trabajo, se puede advertir una sensibilidad mayor por parte del IB, ya que se observa un descenso del IB aún para las menores dosis. Si bien es importante comentar que el IM podría encontrarse más afectado que el IB ya que las células analizadas podrían no estar en la misma fase del ciclo celular y esta heterogeneidad podría resultar en una mayor variabilidad dependiente del grado de sincronización del cultivo. Si se considerara que el IB contabiliza células en la interfase del ciclo celular y su extensión en el tiempo es mucho mayor a la metafase (Lukas *et al.*, 2004), la sincronización del cultivo estaría

afectando en menor medida el valor final de IB.

Este es el primer estudio que analiza el efecto de RU sobre la respuesta linfocitaria a la PHA utilizando el biomarcador IB en una especie autóctona de Argentina. La literatura refiere que los inmunotóxicos producen alteraciones en el sistema inmune pudiendo atenuar su respuesta y consecuentemente crear susceptibilidad a infecciones o desarrollo de tumores (Vial *et al.*, 1996; Wozniak *et al.*, 2018). Si bien se observa una menor respuesta linfocitaria en ejemplares de *C. villosus* expuestos a RU, el IB por sí solo no puede dar por concluido un estudio de biomonitorio. En este sentido, el IB debería ser parte de una batería de ensayos con distintos biomarcadores complementarios; que puedan ser evaluados en organismos centinela (como en este caso) o en otros diseños posibles, en estudios de repercusión ambiental. Estos resultados en una especie de fauna silvestre se constituyen en nueva evidencia que da sostén a la preocupación de cómo conservar la biodiversidad en regiones de actividad agrícola de nuestro país sin reducir a la mayor brevedad posible, la carga de contaminantes producidos por la aplicación intensiva de agroquímicos.

#### Agradecimientos:

Parte del proyecto fue financiado por el PID 15-003/16 (MSM) de la Universidad de Morón, Argentina. A M. C. Gonzalez por su asistencia en el cuidado de los animales.

#### Bibliografía

- Abba AM, Superina M (2010). The 2009/2010 armadillo red list assessment. *Edentata*, 11(2): 135-184.
- Abba AM, Zufiaurre E, Codesido M, Bilenca DN (2015). Burrowing activity by armadillos in agroecosystems of central Argentina: Biogeography, land-use and precipitation effects. *Agric Ecosyst Envir*, 200: 54-61.
- Akiyama M, Yamakido M, Kobuke K, Dock DS, Hamilton HB, Awa AA, Kato H (1983). Peripheral lymphocyte response to PHA and T cell population among atomic bomb survivors. *Radiat Res*, 93(3): 572-580.
- Anadón A, Martínez-Larranaga MR, Martínez MA, Castellano VJ, Martínez M, Martín MT, Nozal MJ, Bernal JL (2009). Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol Lett*, 190(1): 91-9
- Basu N, Scheuhammer AM, Bursian SJ, Elliott J, Rouvinen-Watt K, Chan HM (2007). Mink as a sentinel species in environmental health. *Environ Res*, 103(1): 130-144.
- Bonansea RI, Filippi I, Wunderlin DA, Marino DJG, Amé MV (2018). The fate of glyphosate and AMPA in a freshwater endorheic basin: an ecotoxicological risk assessment. *Toxics*, 6(1): 3.
- Castillo-Cadena J, González-Mercado AL, Hernández-Caballero N, Juan ERS, Álvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E (2013). Immunotoxic damage in floriculturists exposed to pesticide mixtures. *J Environ Sci Heal B*, 48(1): 33-39.
- Clair É, Mesnage R, Travert C, Séralini GÉ (2012). A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol Vitro* 26:269-279.
- Cooper D Pellis NR (1998). Suppressed PHA activation of T lymphocytes in simulated microgravity is restored by direct activation of protein kinase C. *J Leukoc Biol*, 63(5): 550-562.
- Corsini E, Sokooti M, Galli CL, Moretto A, Colosio C (2013). Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology*, 307: 123-135.
- De la Torre FR, Ferrari L, Salibián A (2000). Long-term in situ toxicity bioassays of the Reconquista River (Argentina) water with *Cyrinus carpio* as sentinel organism. *Water Air Soil Poll*, 121: 205-215.
- El-Gendy KS, Aly NM, El-Sebae AH (1998). Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *J Environ Sci Heal B*, 33(2): 135-149.
- EPA (2016) Glyphosate issue paper: evaluation of carcinogenic potential. [https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/glyphosate\\_issue\\_paper\\_evaluation\\_of\\_carcinogenic\\_potential.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/glyphosate_issue_paper_evaluation_of_carcinogenic_potential.pdf). Accessed 10 Apr 2018
- Gawron A, Górski G, Glowniak K (1990). Increased proliferation of phytohaemagglutinin (PHA)-stimulated human leucocytes after 8-methoxypsoralen treatment. *J Pharm Pharmacol*, 42(3): 194-195.



- George JC (1999). Birds as bioindicators of ecotoxicological effects of heavy metal pollution. *J Anim Morphol Physiol*, 46: 1–22.
- Iodice OH (2010). Armadillos y Zarigüeyas como Modelos Experimentales en la Investigación Biomédica: Contribuciones a la Generalización de su Uso. Tesis Doctoral, Universidad de Morón, 2010 (MS).
- IARC (2017) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans—volume 112: some organophosphate insecticides and herbicides. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/mono112.pdf>. Accessed 10 June 2018
- Latorre MA, López González EC, Larriera A, Poletta GL, Siroski PA (2013). Effects of in vivo exposure to Roundup® on immune system of *Caiman latirostris*. *J immunotoxicol*, 10(4): 349-354.
- Lahvis GP, Wells RS, Kuehl DW, Stewart JL, Rhinehart HL, Via CS (1995). Decreased lymphocyte responses in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) are associated with increased concentrations of PCBs and DDT in peripheral blood. *Environ Health Persp*, 103(suppl 4): 67-72.
- LeBlanc GA, Bain LJ (1997). Chronic toxicity of environmental contaminants: sentinels and biomarkers. *Environ Health Persp*, 105(suppl 1): 65-80.
- Lee TP, Moscati R, Park BH. (1979). Effects of pesticides on human leukocyte functions. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 23, 597:609.
- Lindberg T, de Ávila RI, Zeller KS, Levander F, Eriksson D, Chawade A, Lindstedt M (2020). An integrated transcriptomic-and proteomic-based approach to evaluate the human skin sensitization potential of glyphosate and its commercial agrochemical formulations. *J Proteomics*, 217: 103647.
- Luaces JP, Rossi LF, Aldana Marcos HJ, Merani, MS (2011). The rete mirabile of the tail, an effective site for sampling sterile blood from armadillos (Dasypodidae, Xenarthra). *Ital J Zool*, 78(1): 63-69.
- Luaces JP, Rossi LF, Chirino MG, Browne M, Merani MS, Mudry MD (2017). Genotoxic effects of Roundup Full II® on lymphocytes of *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Mammalia): in vitro studies. *PloS one*, 12(8): e0182911.
- Lukas J, Lukas C, Bartek J (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA repair*, 3(8-9): 997-1007.
- Lupi L, Bedmar F, Puricelli M, Marino D, Aparicio VC, Wunderlin D, Miglioranza KS (2019). Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. *Chemosphere*, 225: 906-914.
- Mehta G, Singh S, Pandey S, Sharma L (2008). Cytotoxic response of endosulfan and chlorpyrifos pesticides in poultry lymphocyte culture. *Toxicol Internat*, 15(2): 97.
- Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE (2014). Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed Res Int*, Article ID 179691.
- Mestre AP, Amavet PS, Vanzetti AI, Moleón MS, Marcó MVP, Poletta GL, Siroski PA (2019). Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). *Ecotox Environ Safe*, 169: 61-67.
- O'Conner TP (2002). National distribution of chemical concentrations of mussels and oysters in the USA. *Mar Environ Res*, 53:117–143.
- Pastorinho MR, Sousa ACA (2020). Pets as sentinels of human exposure to neurotoxic metals. En: *Pets as sentinels, forecasters and promoters of human health*. Springer International Publishing, Cham, pp 83–106
- Pengue WA (2005). Transgenic crops in Argentina: the ecological and social debt. *Bull Sci Technol Soc*, 25: 314–322.
- Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ Pollut*, 156: 61–66.
- Pistl J, Kovalkovičová N, Holovská V, Legáth J, & Mikula I (2003). Determination of the immunotoxic potential of pesticides on functional activity of sheep leukocytes in vitro. *Toxicology*, 188(1): 73-81.
- Poletta GL, López González EC, Burella PM, Romito ML, Siroski PA, Mudry MD (2017). Biomarkers of environmental contamination in reptile species: the

- effect of pesticide formulations on broad-snouted caiman *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae), en: Larramendy, ML (Ed.) Issues in Toxicology No. 33, "Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Aquatic Models", Chap. 20, 2017, pp. 467-517, Royal Soc. Chem. Cambridge, UK, p. 546.
- Primost JE, Marino DJ, Aparicio VC, Costa JL, Carriquiriborde P (2017). Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ Pollut*, 229: 771-779.
  - Rebière, P, Mavoori H (2020). The Bayer–Monsanto fusion: countering brand tarnishing and rebuilding reputation. *J Bus Strat*. 41(1): 27-37.
  - Romano MA, Romano RM, Santos LD, Wisniewski P, Campos DA, Souza PBD, Viau P, Bernardi MM, Nunes MT, Oliveira CAD (2011). Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch Toxicol*, 86(4): 663-673.
  - Ronco AE, Marino DJG, Abelando M, Almada P, Apartin CD (2016). Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ Monit Assess*, 188(8): 458.
  - Rossi LF, Luaces JP, Browne M, Chirino MG, Merani MS, Mudry MD (2016). *Chaetophractus villosus* as a sentinel organism: baseline values of mitotic index, chromosome aberrations and sister chromatid exchanges. *Mutat Res/Gen Tox En*, 796: 40-45.
  - Rossi LF, Luaces JP, Palermo AM, Merani MS, Mudry MD (2018). Cytogenetic damage in peripheral blood cultures of *Chaetophractus villosus* exposed in vivo to a glyphosate formulation (Roundup). *Ecotoxicol Environ Saf*, 157:121-127.
  - Schaumburg G, Poletta G, Sirosky P, Mudry MD. (2016) (Genotoxicity induced by Roundup (Glyphosate) in Tegu Lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pestic Biochem Physiol*. 13: 71-78.
  - Seralini GE, Mesnage R, Defarge N, Gress S, Hennequin D, Clair E, Malatesta M, Vandomois JSD (2013). Answers to critics: why there is a long term toxicity due to a Roundup-tolerant genetically modified maize and to a Roundup herbicide. *Food Chem Toxicol*, 53: 461-468.
  - Siroski PA, Poletta GL, Mudry MD. (2017). The lizard *Salvator merianae* (Squamata, Teiidae) as a valid indicator in toxicological studies, en: Larramendy, M.L. (Ed.) Issues in Toxicology No. 32, "Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Terrestrial Models", Chap. 11, 2017, pp. 228-251, Royal Soc. Chem. Cambridge, UK, p. 340.
  - Thrasher JD, Heuser G, Broughton A (2002). Immunological abnormalities in humans chronically exposed to chlorpyrifos. *Arch Environ Health*, 57(3): 181-187.
  - Vial T, Nicolas B, Descotes J (1996). Clinical immunotoxicity of pesticides. *J Toxicol Environ Health*, 48(3): 215-229.
  - Vine MF, Stein L, Weigle K, Schroeder J, Degnan D, Tse CK, Hanchette C, Backer L (2000). Effects on the immune system associated with living near a pesticide dump site. *Environ Health Persp*, 108(12): 1113-1124.
  - Wells RS, Rhinehart WL, Hansen LJ, Sweeney JC, Townsend FI, Stone R, Casper DR, Scott MD, Hohn AA, Rowles TK (2004). Bottlenose dolphins as marine ecosystem sentinels: developing a health monitoring system. *Ecohealth* 1: 246–254.
  - Wozniak E, Sicinska P, Michalowicz J, Wozniak K, Reszka E, Huras B, Zakrzewski J, Bukowska B (2018). The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mono- nuclear cells - genotoxic risk assessment. *Food Chem Toxicol*, 120: 510-522.
  - Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta*, 606: 135–150.

## Anexo

**Tabla I.** Registro de mediciones de consumo diario de agua (mL) de un ejemplar hembra de *C. villosus* de 7 meses de edad. Los días en que no se pudo realizar la medición se indican como n/a.

Fecha	Consumo (mL)	Fecha	Consumo (mL)
02/01/2018	61	05/07/2018	56
11/01/2018	100	06/07/2018	32
13/01/2018	n/a	13/07/2018	63
15/01/2018	82	19/07/2018	n/a
20/01/2018	93	20/07/2018	35
25/01/2018	105	26/07/2018	44
27/01/2018	82	03/08/2018	n/a
01/02/2018	92	11/08/2017	36
04/02/2018	72	18/08/2017	39
05/02/2018	110	25/08/2017	44
10/02/2018	89	01/09/2017	62
14/02/2018	80	07/09/2017	33
19/02/2018	111	08/09/2017	47
22/02/2018	n/a	14/09/2017	71
23/02/2018	80	16/09/2017	n/a
27/02/2018	104	28/09/2017	55
01/03/2018	91	29/09/2017	22
04/03/2018	83	06/10/2017	27
09/03/2018	83	12/10/2017	n/a
15/03/2018	65	19/10/2017	32
16/03/2018	51	24/10/2017	88
22/03/2018	22	31/10/2017	60
26/03/2018	40	03/11/2017	65
05/04/2018	n/a	07/11/2017	103
12/04/2018	57	14/11/2017	75
13/04/2018	51	17/11/2017	90
20/04/2018	55	21/11/2017	99
26/04/2018	31	24/11/2017	82
27/04/2018	32	28/11/2017	24
04/05/2018	n/a	04/12/2017	55
11/05/2018	36	05/12/2017	61
22/05/2018	n/a	06/12/2017	30
28/05/2018	51	11/12/2017	n/a
01/06/2018	30	12/12/2017	10
08/06/2018	n/a	13/12/2017	92
15/06/2018	n/a	18/12/2017	73
19/06/2018	40		
28/06/2018	35		
29/06/2018	22		