

## 25. Medio Ambiente

### **Análisis preliminar de los efectos causados por la exposición al herbicida glifosato (Roundup®) en testículo de neonatos de *Caiman yacare***

Delssin, Andrea R.; Arrieta, M. Belén; Alvarez, B. Beatriz; Siroski, Pablo A.; Lombardo, Daniel M.

delssinandrea@gmail.com; belenarrieta@hotmail.com; alvarezblancabeatriz@yahoo.com.ar;  
cocokaima@hotmail.com; dlombard@fvet.uba.ar

Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura

Universidad Nacional del Nordeste

---

### **Resumen**

El presente estudio aporta datos preliminares acerca de las alteraciones testiculares en neonatos de *Caiman yacare* expuestos al herbicida glifosato (Roundup®) durante el desarrollo embrionario. Para tal estudio se colectaron nidos de huevos de yacaré, se trasladaron al laboratorio y luego se dividieron los huevos en tres grupos para comenzar con el ensayo de toxicidad: un primer grupo como control con agua corriente, un segundo grupo experimental tratado con 250 µg/huevo de dicho herbicida y un tercer grupo experimental tratado con 1000 µg/huevo del herbicida. Los huevos se incubaron a 33°C de temperatura hasta la eclosión y luego se procesaron los testículos para realizar el análisis histológico. Los neonatos del grupo control presentaron túbulos seminíferos bien definidos, con espermatogonias y células de Sertoli, rodeados por la membrana basal. El tejido intersticial consistió en células de Leydig y abundantes capilares sanguíneos. Por otro lado, los neonatos de los grupos expuestos a 250 y 1000 µg/egg del herbicida presentaron alteraciones a nivel de los túbulos seminíferos, como ser desorganización del epitelio germinal y la membrana basal pobremente definida. Si bien estos resultados son preliminares demuestran que existen alteraciones a nivel gonadal posiblemente causadas por la exposición al herbicida.

**Palabras clave:** yacarés, testículos, glifosato, toxicidad.

### **Introducción**

Gran parte de la información disponible revela que los agrotóxicos son justamente tóxicos para los organismos acuáticos o asociados al agua en alguna etapa de su

ciclo de vida, ocasionando diferentes trastornos a nivel del desarrollo gonadal, en fertilidad, bajas tasas de eclosión en especies ovíparas, disminución de la viabilidad de crías y alteraciones a niveles

hormonales o en el comportamiento sexual de los adultos, y por lo tanto en el éxito reproductivo de las especies (Committee on Hormonally Active Agents in the Environment, 1999; Guillette Jr. *et al.*, 2000; Guillette Jr. & Gunderson, 2001; Sánchez-Bayo, 2011). Los productos de control de malezas, con glifosato como ingrediente activo, se encuentran entre los herbicidas más ampliamente utilizados en el mundo (Howe *et al.*, 2004). Estos agrotóxicos se dispersan por el agua y suelo, afectando a los animales silvestres que se desarrollan en las cercanías de los cultivos tratados. Por su lado, los yacarés tienen la desventaja de estar expuestos a dichos agentes en cualquier etapa de su ciclo de vida y más aun durante el desarrollo embrionario (Novillo *et al.*, 2005; Weir *et al.*, 2010). Asimismo, debido a la expansión agrícola en las zonas de distribución de las especies de yacarés en Argentina y al ser consideradas monitores biológicos de contaminación ambiental (Mitchellmore *et al.*, 2005) se han realizado estudios respecto de los efectos producidos por la exposición al glifosato durante el desarrollo embrionario. Estos trabajos han demostrado la capacidad genotóxica del glifosato, observándose alteraciones enzimáticas y metabólicas, así como el retraso en el crecimiento de los embriones (Poletta *et al.*, 2009; Poletta *et al.*, 2011). Sin embargo, son pocos los trabajos que aportan información acerca

de los efectos adversos sobre el sistema reproductor.

### Objetivo

Analizar en neonatos de *Caiman yacare* alteraciones en el testículo provocadas por la exposición al herbicida Roundup® durante el desarrollo embrionario.

### Materiales y Métodos

Se analizaron neonatos machos de *C. yacare* obtenidos a partir de la incubación de huevos a una temperatura de 33°C, debido a que esta especie posee determinación sexual por temperatura. Los huevos fueron colectados en zonas de humedales como parte del Programa “Yacaré Porá” en la Provincia de Corrientes y luego trasladados al laboratorio para comenzar con la incubación (Fig. 1a) y el ensayo de toxicidad. Para esto se dividieron los huevos en tres grupos (10 huevos/grupo): un grupo como control negativo (tratado con agua corriente) y dos grupos experimentales expuestos uno a 250 µg/huevo y el otro a 1000 µg/huevo de la formulación a base de glifosato (Roundup®). Dicha exposición se realizó en estadios tempranos post-oviposición y tópicamente sobre la cáscara del huevo (Fig. 1b). Los neonatos fueron sacrificados con sobredosis de Carticaina-L-adrenalina, siguiendo las recomendaciones propuestas por The Herpetological Animal Care and Use

Committee (American Society of Ichthyologists and Herpetologists) (Beaupre *et al.*, 2004) y aprobadas por el Comité de Ética de la UNNE. Luego, se extrajeron los testículos y se fijaron con solución de Bouin. Posteriormente se confeccionaron preparados histológicos de los testículos siguiendo el protocolo convencional de deshidratación, impregnación e inclusión en parafina, se obtuvieron cortes de 4-5  $\mu\text{m}$  de espesor con micrótopo rotatorio tipo Spencer y se colorearon con Hematoxilina-Eosina (H-E). Estos cortes se analizaron con microscopio óptico Leica DM500 y las imágenes se capturaron con cámara digital ICC50HD incorporada al microscopio óptico (ambos marca Leica inc), utilizando el software LAZ EZ Leica inc para el procesamiento de las imágenes. La caracterización histológica del testículo se realizó siguiendo lo propuesto Smith & Joss (1993) y Moore *et al.* (2010).

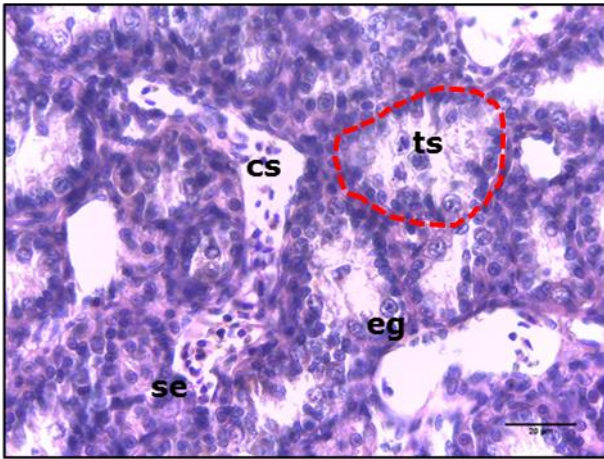
## Resultados

Los testículos correspondientes al control negativo (Fig. 2) se caracterizaron por la presencia de túbulos seminíferos bien diferenciados y redondeados con abundantes espermatogonias y células de Sertoli apoyados sobre la membrana basal bien definida. En el tejido intersticial se observaron células de Leydig, abundantes capilares sanguíneos y matriz extracelular. Los ejemplares, expuesto a

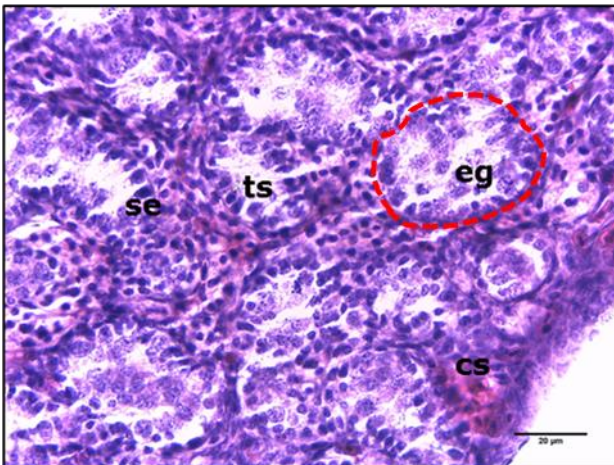
250  $\mu\text{g}$ /huevo de glifosato (Fig. 3), se caracterizaron por la presencia de túbulos seminíferos también bien definidos, pero con espermatogonias y células de Sertoli desorganizadas hacia el centro de los túbulos. Los neonatos, expuestos a 1000  $\mu\text{g}$ /huevo de glifosato (Fig. 4), presentaron túbulos seminíferos tortuosos con un epitelio germinal muy desorganizado. Las espermatogonias se encontraban en el centro del túbulo sin apoyarse en la membrana basal, la cual se observó poco definida. Todos los ejemplares tratados con glifosato presentaron el tejido intersticial compuesto por abundantes capilares sanguíneos, células de Leydig y matriz extracelular.



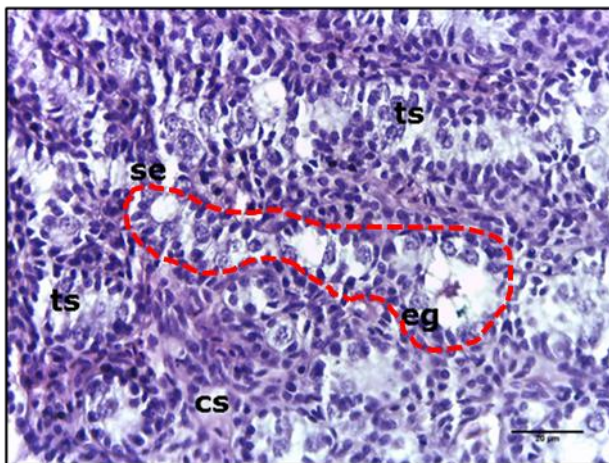
**Fig. 1.** Incubación de huevos de *Caiman yacare*. **a)** Batea plástica con huevos para ser colocada dentro de una incubadora regulada a 33°C. **b)** Exposición tópica de diferentes concentraciones de una formulación a base de glifosato sobre la cáscara del huevo al principio del desarrollo embrionario.



**Fig. 2.** Corte transversal de testículo del neonato control de *Caiman yacare*. Referencias: **cs**: capilar sanguíneo, **eg**: espermatogonia, **se**: célula de Sertoli, **ts**: túbulo seminífero. Coloración: H-E. Barra: 20µm. Magnificación: X400.



**Fig. 3.** Corte transversal de testículo del neonato expuesto a 250 µg/huevo de glifosato de *Caiman yacare*. Referencias: **cs**: capilar sanguíneo, **eg**: espermatogonia, **se**: célula de Sertoli, **ts**: túbulo seminífero. Coloración: H-E. Barra: 20µm. Magnificación: X400.



**Fig. 4.** Corte transversal de testículo del neonato expuesto a 1000 µg/huevo de glifosato de *Caiman yacare*. Referencias: **cs**: capilar sanguíneo, **eg**: espermatogonia, **se**: célula de Sertoli, **ts**: túbulo seminífero. Coloración: H-E. Barra: 20µm. Magnificación: X400.

## Conclusiones

En neonatos de *Caiman yacare* del grupo control, los testículos están bien organizados con espermatogonias y células de Sertoli apoyados sobre una membrana basal definida. En cambio, en neonatos que fueron expuestos en estadios tempranos del desarrollo al herbicida glifosato presentan principalmente alteraciones en la organización del epitelio germinal de los testículos. Sin bien estos resultados son preliminares se puede inferir que las diferencias encontradas a nivel gonadal, entre los grupos tratados y el grupo control, podrían deberse a alteraciones causadas por la exposición al glifosato. Además, futuros estudios se centrarán en el análisis comparativo de un rango de concentraciones del herbicida en neonatos de *Caiman yacaré*, que ya han demostrado tener efectos tóxicos en este género. Asimismo, cabe destacar que estos serán de gran importancia para detectar anomalías estructurales que puedan afectar la reproducción y los riesgos que corren las poblaciones de *C. yacare* estando expuestas a dicho herbicida.

## Bibliografía

- Beaupre, S. J., Jacobson, E. R., Lillywhite, H. B., & Zamudio, K. (2004). Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory

Research. Miami, USA: American Society of Ichthyologists and Herpetologists.

- Committee on Hormonally Active Agents in the Environment, National Research Council. (1999). *Hormonally Active Agents in the Environment*. Washington DC, USA: National Academies Press.
- Guillette Jr, L. J., Crain, D. A., Gunderson, M. P., Kools, S. A., Milnes, M. R., Orlando, E. F., Rooney, A. A., & Woodward, A. R. (2000). Alligators and endocrine disrupting contaminants: A current perspective. *American Zoologist*, 40(3), 438-452.
- Guillette Jr., L. J., & Gunderson, M. P. (2001). Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction*, 122(6), 857-864.
- Howe, C. M., Berrill, M., Pauli, B. D., Helbing, C. C., Werry, K., & Veldhoen, N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(8), 1928-1938.
- Mitchelmore, C. L., Rowe, C. L., & Place, A. R. (2005). Tools for assessing contaminant exposure and effects in reptiles. In S. C. Gardner, & E. Oberdörster (Eds.), *Toxicology of Reptiles* (pp. 63-122). Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group.
- Moore, B. C., Hamlin, H. J., Botteri, N. L., Lawler, A. N., Mathavan, K. K., & Guillette Jr., L. J. (2010). Post-hatching development of *Alligator mississippiensis* ovary and testis. *Journal of Morphology*, 271(5), 580-595.
- Novillo, A., Kitana, N., Marquez, E., & Callard, I. P. (2005). Reptilian genotoxicity. In S. C. Gardner, & E. Oberdörster (Eds.), *Toxicology of Reptiles* (pp. 241-266). Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group.
- Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., & Mudry, M. D. (2009). Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2), 95-102.
- Poletta, 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 852-859.
- Sánchez-Bayo, F. (2011). Impacts of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems. In F. Sánchez-Bayo, P. J. van den Brink, & R. M. Mann (Eds.), *Ecological Impacts of Toxic Chemicals* (Vol. 2011, pp. 75-107). Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers.

- Smith, C. A., & Joss, J. M. (1993). Gonadal sex differentiation in *Alligator mississippiensis*, a species with temperature-dependent sex determination. *Cell and Tissue Research*, 273(1), 149-162.
- Weir, S. M., Suski, J. G., & Salice, C. J. (2010). Ecological risk of anthropogenic pollutants to reptiles: Evaluating assumptions of sensitivity and exposure. *Environmental Pollution*, 158(12), 3596-3606.

### **Agradecimientos**

Agradecemos al personal del Programa de Conservación y Uso Sustentable “Yacaré Porá” por facilitar los huevos de yacaré.

### **Financiamiento**

Este trabajo fue financiado por el PI: "Desarrollo Gonadal y Biología Reproductiva de Vertebrados del Nordeste de Argentina". SGCyT-UNNE (16F011). Director: Dr. D. M. Lombardo; Co-Director: Lic. B. B. Alvarez. Sub-Director: Lic. M. T. Sandoval.