



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGROQUÍMICOS SOBRE LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS EN EJEMPLARES DE SALVATOR MERIANAE (IGUANA OVERA).

Carletti, Julieta^{1,2}

¹Laboratorio de Genética, FHUC-UNL.

²Laboratorio de Zoología Aplicada (Anexo Vertebrados).

Director/a: Poletta, Gisela Laura

Codirector/a: Amavet, Patricia Susana

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Plaguicidas, Efectos tóxicos, Capacidad fagocítica.

INTRODUCCIÓN

La especie *Salvator merianae*, vulgarmente llamada “iguana o lagarto overo”, es endémica de América del Sur y cuenta con una amplia distribución en Argentina. En Santa Fe, el hábitat ocupado por esta especie se superpone con áreas destinadas a la agricultura (principalmente al monocultivo de soja), y además, la época de siembra coincide con los meses de mayor actividad de este lagarto, incluyendo la etapa reproductiva. Esto implica que los animales se encuentren constantemente expuestos a los plaguicidas utilizados en estas prácticas. El Sistema Inmune, tanto Innato (SII) como Adquirido (SIA), constituye un mecanismo de defensa de los organismos contra agentes externos. Los macrófagos son células que juegan un rol importante en el SII, siendo su función principal la fagocitosis. En este sentido, la exposición de *S. merianae* a ciertos plaguicidas, podría afectar la actividad fagocítica de los macrófagos generando un sistema indicador de inmunotoxicidad de gran sensibilidad. En este proyecto se propuso evaluar el posible efecto de plaguicidas de amplio uso en Argentina, asociados principalmente al cultivo de soja, sobre la actividad fagocítica de los macrófagos en iguana overa, mediante una exposición crónica de estos animales en condiciones semi-controladas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar posibles efectos inmunotóxicos de formulaciones plaguicidas de amplio uso en Argentina, sobre la actividad fagocítica de macrófagos en ejemplares de *S. merianae*.

Objetivos específicos

1) Realizar el ajuste metodológico de técnicas para evaluación de la actividad fagocítica y la determinación de valores basales para la especie.

- 2) Evaluar efectos tóxicos de la mezcla binaria de los herbicidas Glifosato + 2-4-D, y del insecticida Clorantraniliprole sobre la actividad fagocítica de los macrófagos en ejemplares de *S. merianae* mediante una exposición crónica en condiciones semi-controladas.
- 3) Transferir la información generada por este estudio a los planes de manejo y conservación que incluyen a esta especie, con el objetivo de evaluar y optimizar las estrategias de uso sustentable.

Título del proyecto: Identificación de nuevos marcadores moleculares para evaluación de poblaciones naturales de *Caiman latirostris* (yacaré overo) sometidas a estrés ambiental.

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: FONCYT

Director/a: Poletta, Gisela Laura

METODOLOGÍA

En esta investigación se busca determinar posibles efectos tóxicos de la mezcla binaria de los herbicidas Glifosato + 2-4-D, y del insecticida Clorantraniliprole en ejemplares juveniles de *S. merianae*, en condiciones semi-controladas. Para esto, se propuso evaluar la capacidad fagocítica de macrófagos provenientes de muestras de sangre extraídas a ejemplares de *S. merianae*, en distintos tratamientos. En principio, fue necesario realizar un ajuste metodológico de varios protocolos, ya que estos nunca se habían aplicado previamente en la especie. El primero consistió en la extracción de células mononucleares (Camussone *et al.*, 2014; Helbert, 2017) a partir de sangre periférica, y se repitió en varias oportunidades con los ajustes necesarios hasta obtener la cantidad de células requerida para las etapas siguientes. Teniendo en cuenta que el tamaño de los animales al momento de la finalización del experimental sería de pequeño a mediano, fue necesario optimizar la metodología de manera de extraer la menor cantidad de sangre posible (Figuras 1, 2 y 3). Luego, se realizó un protocolo para cuantificar la cantidad de bacterias de la especie *Escherichia coli* presentes en una solución de densidad óptica 0,5 siguiendo el método de Miles & Mirsa (1938). La exactitud de este conteo es muy necesaria ya que al momento de realizar el ensayo de fagocitosis se debe tener en cuenta el múltiplo óptimo de infección (MOI), que debe ser de 100 bacterias por célula. Por lo tanto, el protocolo debió repetirse hasta obtener un mismo resultado en un mínimo de tres conteos, para que sea considerado confiable (Figuras 4 y 5). El siguiente paso consistió en la aplicación de un protocolo de marcación de bacterias con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) para su identificación en citometría de flujo. Este ensayo se realizó reiteradas veces hasta lograr que todas las bacterias se marcaran con la misma intensidad. Una vez logrado el correcto ajuste, se preparó un stock de bacterias marcadas, necesario para la puesta a punto de los próximos protocolos y el ensayo experimental. El último protocolo puesto a punto fue el de fagocitosis. El mismo consistió en exponer las células mononucleares de *S. merianae* a las bacterias marcadas con FITC, teniendo en cuenta el MOI. En cada tubo de fagocitosis se colocaron 1×10^6 células mononucleares y 1×10^8 bacterias. La asociación de las bacterias a las células mononucleares se corroboró empleando tanto microscopio de fluorescencia como citómetro de flujo. Actualmente, se está trabajando en la aplicación de un protocolo para neutralizar la fluorescencia de las bacterias que no fueron internalizadas (Ramet *et al.*, 2002), ya que con la

metodología optimizada hasta el momento detectamos no sólo las bacterias fagocitadas por las células mononucleares sino también otras adheridas a la membrana de las mismas.

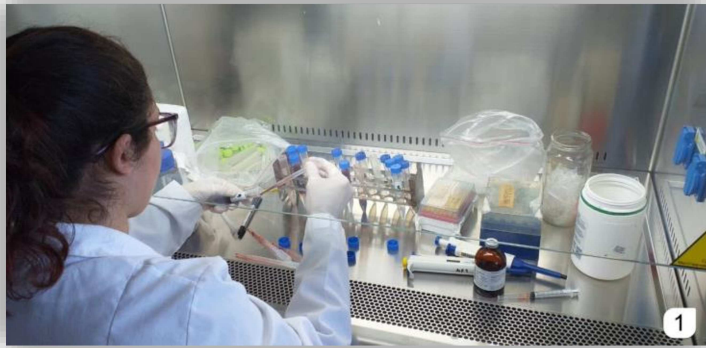


Figura 1: Extracción de células mononucleares.

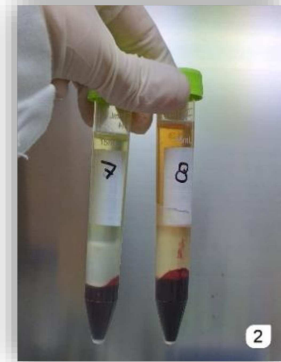


Figura 2: Células mononucleares en la interfase, separadas con Ficol-paque®.

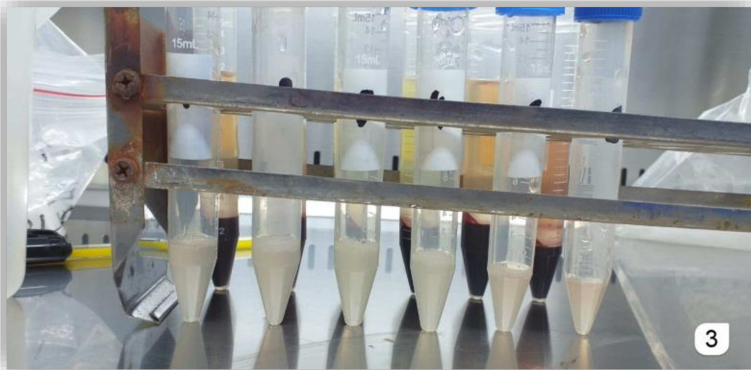


Figura 3: Células mononucleares extraídas a partir de 6 ejemplares de *S. merianae*.

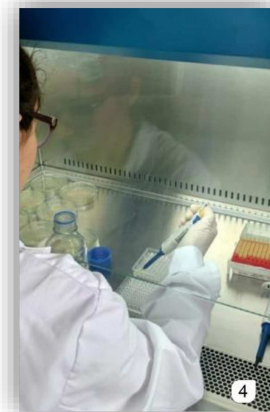


Figura 4: Diluciones seriadas de solución de *E. coli* en PBS.



Figura 5: Placa de Petri con siembra de diluciones seriadas de *E. coli* en PBS.

Una vez terminada esta primera etapa, se continuará con la segunda, que consiste en un diseño experimental en el cual se expondrán a dos grupos de ejemplares de *S. merianae* a los plaguicidas anteriormente mencionados, y un grupo control sin exposición. La exposición se realizará teniendo en cuenta el cronograma de aplicación en campo y las concentraciones recomendadas en el marbete o ficha técnica de cada agroquímico. Al finalizar el período de exposición, se tomarán muestras de sangre de cada individuo, y se aplicarán los protocolos ajustados en la primera etapa.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados de esta primera etapa muestran que se logró obtener un mínimo de 3.000.000 de células mononucleares a partir de 5 ml de sangre de iguana, cantidad suficiente para continuar con los siguientes ensayos. En cuanto al protocolo para cuantificar la cantidad de bacterias *-Escherichia coli-* se contó un total de $3,63 \times 10^8$ bacterias /ml de solución de buffer fosfato salino (PBS, del inglés: *phosphate buffered saline*), con una DO de 0,5, medida a 600 nm de longitud de onda, en espectrofotómetro. Se corroboró el correcto ajuste de los protocolos optimizados utilizando citómetro de flujo.

Los resultados obtenidos hasta el momento se relacionan con el primer objetivo planteado en el plan de trabajo. El ajuste de las distintas técnicas detalladas anteriormente permitirá luego la evaluación de la actividad fagocítica de macrófagos como marcador de inmunotoxicidad en iguanas expuestas a formulaciones de plaguicidas. Los resultados del experimental se obtendrán luego de finalizada la segunda etapa. Este estudio aportará valiosos datos en esta área disciplinar muy poco explorada en especies silvestres, y el ajuste de los distintos protocolos permitirá continuar ampliando esta línea de investigación.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Camussone, C. M., Pujato, N., Renna, M. S., Veaute, C. M., Morein, B., Marcipar, I. S., Calvino, L. F., 2014. Immune response and functional role of antibodies raised in heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 lysate and recombinant antigens vaccine formulated with Iscom Matrix adjuvant. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 162(3-4), 96-107.

Helbert, M., 2017. *Immunology for Medical Students.* Third Edition. Elsevier. Philadelphia.

Miles, A. A., Misra, S. S., Irwin, J. O., 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiol. Infec.* 38(6), 732-749.

Rämet, M., Manfruelli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., Ezekowitz, R. A. B., 2002. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nat.* 416(6881), 644.