



Paola M. Peltzer

Plan de Gestión de Datos

INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO

1. – Datos del Proyecto

- Título del Proyecto (en castellano)

EL COLAPSO DE LOS SISTEMAS ACUÁTICOS POR CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE VINCULADOS A LA CARDIOTOXICIDAD EN ANFIBIOS ANUROS

- Título del Proyecto (en inglés)

THE COLLAPSE OF AQUATIC SYSTEMS BY CONTAMINANTS OF EMERGING CONCERN LINKED TO CARDIOTOXICITY IN ANURAN AMPHIBIANS

- Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

Los contaminantes de preocupación emergente (CPEs) son causales de diferentes efectos deletéreos a la salud humana, ambiente y fauna silvestre. Generalmente, estos contaminantes incluyen a los fármacos, productos de uso personal y desinfección, plaguicidas patentados como antibióticos, y metales de uso veterinario, y cuya presencia en sistemas acuáticos, su importancia y los efectos (toxicidad) han alertado a la comunidad científica en los últimos años. Se han registrado en agua potable y han producido graves declives poblacionales de depredadores superiores y carroñeros, como así han aumentado la resistencia de bacterias. Los CPEs resultan del vertido de efluentes urbanos, industriales y hospitalarios sin tratamientos, falta de adecuados tratamientos o inactivación de estos o sus residuos, uso inadecuado de fertilizantes orgánicos, aplicación de antibióticos para uso agrícola y veterinario, entre otros. Aunque se encuentran en bajas concentraciones, los organismos acuáticos resultan expuestos crónicamente durante su ciclo de vida, pudiendo relacionarse con efectos subletales en el crecimiento y desarrollo, metabolismo y fisiología, como también disrupciones en el sistema endócrino y reproductivo. Comúnmente, los CEPs por su diversidad, químico-dinámica y sinergia hacen que las evaluaciones y caracterizaciones de riesgo Ecotoxicológicos para la fauna silvestre sean necesarias, sobre todo para aquellos organismos indicadores y de alerta temprana, como lo son los anfibios. En este sentido, recientemente algunos trabajos consideran a este grupo de vertebrados como organismos modelos por su relevancia biomédica y fundamental para el desarrollo del futuro estrategias regenerativas como el entendimiento fisiológico cardiogénico y neurotóxico de contaminantes que aún no tienen ninguna regulación ambiental y que son ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria.

. El presente proyecto plantea **evaluar el riesgo que producen los CPEs** (e.g. fármacos de uso veterinario y herbicidas con efecto antibiótico) de mayor ocurrencia en distintos cuerpos de **agua sobre la cardiogénesis y su potencial cardiotoxicidad (biomarcadores cardíacos, teratogénicos e cardio-histopatológicos) en larvas de anfibios anuros** de la región centro-este de Argentina (principalmente especies con distribución en el tramo medio del Río Paraná. Dado que los mecanismos organogénicos y la enzimología cardiológica y neurológica y la hormono-dependencia tiroidea a estos procesos en anfibios son similares y ortólogos a la del hombre, los resultados a obtener podrían aumentar las evidencias para interpretar el incremento desmedido de malformaciones cardíacas, neurológicas y de alteraciones en la funciones cardiológicas y cognitivas, principalmente en niños que habitan en áreas núcleo de producción agrícola como de presencia de CPEs.

- Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen

Contaminants of Emerging Concern (CECs) are causes of different deleterious effects on human health, the environment and wildlife. Generally, these contaminants include drugs, personal care use and disinfection products, patented pesticides such as antibiotics, and metals for veterinary use whose presence in aquatic systems, importance and effects (toxicity) have alerted the scientific community in the last years. They have been recorded in drinking water and they have produced severe population declines of superior predators and scavengers, as well as increased resistance to bacteria. The CECs result from the discharge of urban, industrial and hospital effluents without treatment, lack of adequate treatments or inactivation of these or their residues, inadequate use of organic fertilizers, application of antibiotics for agricultural and veterinary use, among others. Although they are found in low concentrations, aquatic organisms are chronically exposed during their life cycle, and can be related to sublethal effects on growth and development, metabolism and physiology, as well as disruptions in the endocrine and reproductive system. Commonly, CECs due to their diversity, chemical-dynamics and synergy make Ecotoxicological risk assessments and characterizations for wildlife necessary, especially for those indicator and



early warning organisms, such as amphibians. In this sense, recently some works consider this group of vertebrates as model organisms due to their biomedical relevance and fundamental for the development of future regenerative strategies such as the cardiogenic and neurotoxic physiological understanding of contaminants that do not yet have any environmental regulation and that are widely used in human and veterinary medicine.

The present project aims to evaluate the risk produced by CPEs (e.g. veterinary drugs and herbicides with antibiotic effect) of higher occurrence in different bodies of water on cardiogenesis and its potential cardiotoxicity (cardiac, teratogenic and cardio-histopathological biomarkers) in larvae of anuran amphibians from the central-eastern region of Argentina (mainly species with distribution in the middle section of the Paraná River. Given that the organogenesis and cardiological performance and thyroid hormone-dependence to these processes in amphibians are similar and orthologous to that of man, the results to be obtained could increase the evidence to interpret the excessive increase in cardiac, neurological and of alterations in cardiological and cognitive functions, mainly in children living in core areas of agricultural production, as well as the presence of CECs.

- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en castellano)

Cardiotoxicidad, anfibios,
contaminantes

- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés)

Carditoxicity, amphibian.
Contaminants

2 – Datos del Director/ar del Proyecto

- Nombre y Apellido

PAOLA MARIELA PELTZER

- Unidad Académica

FACULTAD DE BIOQUIMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

- Teléfono oficial de contacto

0342-4575215 INT 196

-Teléfono móvil de contacto

0343-154500382

-E-mail del Director/a del Proyecto

PAOLAPELTZER@HOTMAIL.COM

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

-Describe la toma de muestras / datos a realizar

- Se realizarán capturas temporales con copos de abertura de malla distinta (renacuajos o puestas de huevos) en cuerpos de agua cercanos o inmersos en agroecosistemas, lagunas de origen pluvial y de conocida afluencia de desechos de feedlots (lavados de corrales, acúmulos de heces de aves de corral). En estos casos de recolección *in situ* los renacuajos recolectados serán colocados en recipientes oscuros con agua de la misma laguna, trasladados inmediatamente (menos de 3 h) a laboratorio para obtención de muestras de sangre, tejidos y para el monitoreo de marcadores cardiológicos y neurológicos.

- En el caso de experimentación en laboratorio se seguirán los protocolos estandarizados por el grupo de trabajo del laboratorio de Ecotoxicología (ESS-FBCB-UNL, <http://anfibios-ecotox-conser.blogspot.com/>), utilizándose para la selección aquellos contaminantes de preocupación emergente de mayor ocurrencia en cuerpos de agua referenciados en trabajos publicados propios o de nuestro país, para la realización de bioensayos bajo condiciones de laboratorio controladas.

- Se utilizarán puestas de huevos y/o embriones en estadios de desarrollo 12-13 (Gosner 1960) para comenzar los bioensayos. Se recolectarán tres puestas de huevos para evitar la homogeneidad genética de especies regionales abundantes, de amplia distribución geográfica neotropical, con estrategias reproductivas de tipo “r” (con oviposiciones individuales de las de 10000 huevos) y que no estén categorizadas en el sistema de categorización de especies de anfibios de la argentina (Vaira et al. 2012) como amenazadas, en riesgo o que sean vulnerables (e.g. *Rhinella arenanum*, *R. dyphyca*, *Scinax nasicus*, *Boana pulchellus*, *Odonthophrynus americanus*).

- El número de individuos por especies a utilizados será aproximadamente de un N = 10 de acuerdo a lo estandarizado para realizar análisis estadísticos para cada indicador o variable por tratamiento y tipo de contaminante. Cabe señalar, que no se puede determinar *a priori* el número total final de ejemplares a utilizar por especie debido a que esto varía ampliamente dependiendo del tipo de contaminante seleccionado, del



período de monitoreo (agudo: 24, 48, 96 h o crónico: > a 10 días), y del tipo de comportamiento de cada especie (bentónico, nectónico). En general, se utilizan entre 30 y 60 individuos, y en numerosos trabajos realizados se describen la metodología de estos tipos de ensayos tanto a escala de laboratorio como de campo en períodos cortos o largos y número mínimo de muestra (Peltzer et al., 2008, 2013, 2017, 2019, Lajmanovich et al., 2010, 2017 entre otros, disponibles en <http://anfibiobio-ecotox-conser.blogspot.com/>). Las puestas de huevo y larvas recolectadas serán aclimatadas, en NUESTRO LABORATORIO (Laboratorio de Ecotoxicología, ESS-FBCB-UNL) (en condiciones controladas de luz y temperatura 16 h luz-8 h oscuridad, 24-26 °C) y serán alimentadas “*ad libitum*” con *Lattuca sativa* (lechuga hervida, por protocolo de trabajo).

- Los animales serán eutanizados según la normativa del ASIH et. al. (2001) con anestésicos (ej. benzocaina). No se utilizará anestesia en ningún caso ya que este procedimiento no es compatible con la medición posterior de los biomarcadores señalados. Para lo cual también se tiene presente la guía estandarizada para el manejo de larvas de anfibios en laboratorio NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1974. *AMPHIBIANS: GUIDELINES FOR THE BREEDING, CARE AND MANAGEMENT OF LABORATORY ANIMALS*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/661>.
 - Las tasas de desarrollo y crecimiento, y anomalías corporales, viscerales y orgánicas se realizarán por observación directa y macro-fotografías digitales (bajo lupa estereoscópica y cámaras del tipo MOTICAM 20 MGP). En casos de atrofia, heterotaxias, y/o formaciones neoplásicas se recurrirá a su valoración histológica, realizado cortes sometidas al protocolo estándar de deshidratación e inclusión en parafina para la obtención de cortes seriados de 7 μm , teñidos con Hematoxilina-Eosina.
 - Se evaluarán las hipertrofias o atrofia del corazón durante la metamorfosis de las larvas, valoración considerada como biomarcador de cardiotoxicidad (Perichon et al., 2017). La tasa cardíaca (heartbeats min^{-1} o pulsaciones por min) se valorará a través de una secuencia de videos digitales de baja velocidad (20-30 fr s⁻¹) (Peltzer et al., 2019). Dos a tres larvas por tratamiento y experimento se distribuirán en placas múltiples se digitalizaran videos de 20 segundos de duración con softwares de captura y con cámaras montadas en trípodes en la parte superior y trans-iluminación constante con cámaras adyacentes (Lajmanovich et al., 2018; Peltzer et al., 2019 <http://anfibiobio-ecotox-conser.blogspot.com/>).
 - Para el estudio de neurotoxicidad evaluando el comportamiento natatorio se utilizarán filmaciones digitales y softwares de seguimiento o *Tracking software* (Smart 3.0.02, Panlab Harvard Apparatus®), Se estima realizar estos para estos marcadores 3 réplicas por tratamiento y utilizar diez larvas por tratamiento (Peltzer et al., 2013 <http://anfibiobio-ecotox-conser.blogspot.com/>).
 - Para medir enzimas y hormonas los individuos expuestos y los controles en estadio larval serán colocadas en viales, conservadas en hielo en refrigeradores portátiles y depositadas en freezer -20°C hasta su determinación en NUESTRO LABORATORIO (*enzimas B-esterasas y del sistema antioxidante* (V); Laboratorio de Ecotoxicología, ESS-FBCB-UNL) y en laboratorios TERCERIZADOS (*hormonas tiroideas y esteroides*; Laboratorio de Servicios Privados ALKEMY DIAGNOSTICO, Santa Fe). En todos los casos se utilizarán tres réplicas con un total de 10 larvas por tratamiento.
- ✓ La determinación de la actividad de las B-esterasas, especialmente la acetilcolinesterasa (AChE) en anfibios consistirá en la lectura espectrofotométrica (Jewey 6405 UV-Vis a una longitud de onda de 410 nm durante un minuto a 25 °C.) de la cinética empleando la acetil-tiocolina como sustrato de reacción, siguiendo el método propuesto por Ellman *et al.* (1961). La actividad de la AChE se expresará como μmol o nmol de sustrato hidrolizado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de tejido según corresponda, empleando los coeficiente de extinción molar de $14.15 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Por otra parte, se medirá la Glutathion S-transferasa (GST) siguiendo los métodos descriptos por Habig *et al.* (1974). La absorbancia será leída en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm, durante un minuto, corregida previamente con un blanco. La actividad GST se expresará como $\text{nmol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ de tejido según corresponda, empleando un coeficiente de extinción molar de $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
- Las determinaciones de contaminantes de preocupación emergente (medicamentos, plaguicidas) en sangre y tejidos de anfibios y agua recolectada de lagunas o de las baterías de experimentos y sus diluciones, serán TERCERIZADAS al Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos (PRINARC-FIQ-UNL), al Laboratorio De Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ), Cátedra de Química Analítica I, FBCB-UNL) y/o al Centro de investigaciones de Medio Ambiente (CIMA, Departamento de Química, Universidad Nacional de la Plata), según corresponda.
 - Para todas las actividades de campo se utilizarán botas, guantes descartables, bolsas de captura de tela que luego serán desinfectadas para la evitar la transmisión de enfermedades o propagación de patógenos. Se aclara que las botas y recipientes utilizados serán desinfectados con solución de hipoclorito de sodio (30%) y alcohol (90%). Además, se dispone de un botiquín de primeros auxilios trasladable a campo.
 - Se declara estar en conocimiento y se aceptan de los reglamentos institucionales de la FBCB de la UNL que regulan la manipulación de muestras biológicas y los procedimientos de disposición de los residuos biológicos y de material descartable que se generen. Asimismo, se conocen los procedimientos de bioseguridad.



<p>– Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad/ser de acceso público? (marque X)</p>	
	NO x
<p>SI. Elija una de las opciones:</p>	
	<p>a) Se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes b) No se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible c) Existe un contrato con un tercero que impide la divulgación d) Otro. Justifique.</p>
<p>– Período de Confidencialidad: Es el período durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El período máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad/serán de acceso público. Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con “X”.</p>	
	1 (UN) año
	2 (DOS) años
	3 (TRES) años
	4 (CUATRO) año
	5 (CINCO) años
	Otro.
	Motivos:



INSTRUCTIVO PARA COMPLETAR EL PLAN DE GESTIÓN (PGD)

El PGD no es un documento definitivo, sino que se desarrollará a lo largo del ciclo de vida del proyecto.

INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO

1 – Datos del Proyecto

Título del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar el título completo del proyecto (en castellano), indicando además el código asignado por la SCAyT.

Título del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar el título completo del proyecto en inglés.

Descripción del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar la descripción del Proyecto en castellano.

Descripción del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar la descripción del Proyecto en inglés.

Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar tres palabras claves descriptivas del Proyecto, en castellano.

Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar tres palabras claves descriptivas del Proyecto, en inglés.

2- Datos del Director/a del Proyecto

Nombre y Apellido del Titular del Proyecto: Nombre completo y apellido del Titular del Proyecto.

Unidad Académica: Nombre de la Unidad Académica a la que pertenece el/la directora/a del Proyecto.

Teléfono oficial de contacto: Número de teléfono de la oficina/laboratorio/Institución del Director/a del Proyecto, donde pueda ser contactado, incluyendo número de área/país (ej: Para Santa Fe: + 54 9 342 4999-9999).

Teléfono móvil de contacto: Número de teléfono móvil del director/ar del Proyecto, donde pueda ser contactado, incluyendo número de área/país.

E-mail del Director/a del Proyecto: Correo electrónico de contacto del Director/a del Proyecto.

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Describe la toma de muestras/datos a realizar: Información descriptiva sobre la toma de muestras que resultarán en datos/conjuntos de datos. La descripción deberá



incluir información de contexto (lugar de toma de los datos; instrumentos, etc.)

Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad/ser de acceso público? Deberá marcar con una “X” la opción correcta. En caso de responder afirmativamente, deberá justificar debidamente, comprendiendo que sólo en casos de extrema excepcionalidad esta restricción de acceso a los datos resulta practicable/aceptable.

Período de Confidencialidad: Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad/serán de acceso público.

Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios.

Deberá indicar los años que considera necesario prorrogar el período de confidencialidad y explicar los motivos.