



## Plan de Gestión de Datos

<b>INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO</b>	
<b>1. – Datos del Proyecto</b>	
<b>- Título del Proyecto (en castellano)</b>	
Parámetros de estrés oxidativo y perfil de ácidos grasos como biomarcadores de condiciones estresantes en organismos de ambientes acuáticos rurales y urbanos. 50520190100049LI	
<b>- Título del Proyecto (en inglés)</b>	
Oxidative stress parameters and fatty acid profile as stressful conditions biomarkers in organisms from urban and agricultural aquatic environments.	
<b>- Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen</b>	
<p>Los ambientes acuáticos están influenciados por las actividades que el hombre desarrolla en su cuenca, ya que hacia allí migran los compuestos utilizados en ella de forma directa o por arrastre con las lluvias. Los organismos acuáticos se ven periódicamente expuestos a los agentes estresores que llegan a dichos ambientes. Uno de los efectos que puede provocar el contacto con sustancias estresoras es el desbalance en el equilibrio oxidativo, ante lo cual pueden observarse modificaciones en las actividades enzimáticas, en la concentración de sustancias reactivas de oxígeno y/o en los niveles de peroxidación lipídica. Por otro lado, las sustancias estresoras pueden provocar una disminución de los índices de diversidad biológica, lo que se traduce en una simplificación de la oferta trófica para los consumidores, provocando modificaciones en la dieta estos. Esta modificación en la dieta tiene su correlato en el perfil de ácidos grasos, el cual se propone poner a prueba como bioindicador de efectos indirectos. En este proyecto se compararán los parámetros de estrés oxidativo y el perfil de ácidos grasos de organismos de ambientes acuáticos utilizando anfibios, crustáceos decápodos y peces. Además, se buscarán sitios con el menor grado de impacto posible, relacionados con ambientes con diferente grado de restricciones de uso de la tierra, las cuales serán utilizadas como sitio con menor grado de impacto. Se determinarán las condiciones físico-químicas y las concentraciones de plaguicidas y metales, se realizará la evaluación de riesgo ecológico y se correlacionarán con las modificaciones encontradas en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo y el perfil de ácidos grasos.</p>	
<b>- Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen</b>	
<p>Aquatic environments are influenced by the human activities developed in nearby areas. Different compounds migrate mainly by drift, spill and run-off. The aquatic biota is periodically exposed to stressor agents. One of the effects that these compounds may produce is the oxidant/antioxidant imbalance, which may be observed by the modifications in enzymatic activities, reactive oxygen substance concentrations and/or lipid peroxidation levels. On the other hand, the stressor agents may cause a decrease in biological diversity indexes, which means a simplification of the trophic offer for the consumers, leading to modifications in their diet. This modification in the diet modifies the fatty acids profile, which is proposed as indirect effect biomarker. In this project, the parameters related with the oxidative stress and in the fatty acid profile belonging from consumers of aquatic environments related with different land uses will be compared, using amphibians, decapod crustaceans and fishes. The physical-chemical parameters and pesticides and metal concentrations will be determined and the ecological risk assessment will be calculated. All these data will be correlated with the modifications found in the parameters related with the oxidative stress and the fatty acid profile.</p>	
<b>- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en castellano)</b>	
ESTRÉS OXIDATIVO; ACIDOS GRASOS; USO DE LA TIERRA; CONDICIONES ESTRESANTES	
<b>- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés)</b>	
OXIDATIVE STRESS; FATTY ACIDS; LAND USE; STRESSFULL CONDITIONS	



<b>2 – Datos del Director/ar del Proyecto</b>
<b>- Nombre y Apellido</b>
Carlos Leandro Negro
<b>- Unidad Académica</b>
INALI (CONICET – UNL) – ESS (FBCB – UNL)
<b>- Teléfono oficial de contacto</b>
4882969
<b>-Teléfono móvil de contacto</b>
3424420587
<b>-E-mail del Director/a del Proyecto</b>
leonegro82@hotmail.com

## DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

### -Describe la toma de muestras / datos a realizar

El primer paso en la ejecución de este diseño será seleccionar los sitios de muestreo. Se establecerán sitios considerados con alto nivel de alteración ambiental y otros con menor o muy poco nivel de alteración ambiental, estableciendo un gradiente de nivel de impacto. Para esto, se evaluarán sitios en los cuales el uso de la tierra se relacione con actividades agrícolas intensivas (ambientes impactados) y ambientes de características similares no impactados, cuyas características físico-químicas, tipo de sustrato, velocidades de corriente, etc. sean similares a los ambientes impactados, con el objetivo de que el impacto antrópico sea la principal variable de cambio en las comunidades bióticas. La selección de los sitios se realizará en función de los lugares que ya hemos trabajado previamente, sobre los cuales se cuenta con información de concentraciones de plaguicidas y metales por investigaciones previas. Los muestreos se realizarán en primavera-verano, que es el momento de mayor utilización de plaguicidas y nutrientes. En el caso de los arroyos, las zonas con alto estrés de origen antrópico se ubicarán en la cuenca del hidrosistema El Chupino – Monje y en la cuenca de la Laguna Paiva – Arroyo Aguiar. Las zonas con menos grado de estrés antrópico serán arroyos relacionados con sitios con diferentes grados de protección (arroyo Las Conchas en la Reserva Natural Manejada “El fisco”; Reserva Natural “La Loca”, Reserva Privada de Usos Múltiples “Federico Wildermuth”). Los ambientes acuáticos afectados por usos urbanos de la tierra serán seleccionados y clasificados considerando tipo y extensión del cuerpo de agua (ej. lago artificial, fuente o cuneta), forma, profundidad, temporalidad, el aislamiento y distancia a otros cuerpos de agua, cobertura vegetal circundante y vegetación acuática, características de la infraestructura, iluminación artificial (presencia, tipo e intensidad), densidad de urbanización, etc., así como las variables físico-químicas de salinidad, pH, nutrientes, plaguicidas y metales.). Las zonas con menor grado de estrés antrópico serán charcas temporarias con condiciones morfológicas, hidrodinámicas y físico químicas similares a las urbanas ubicadas en el valle aluvial del río Paraná, con el objetivo de que las modificaciones en las comunidades bióticas estén relacionadas con el uso urbano de la cuenca circundante. Algunos permisos de colecta están en trámite por el PICT relacionado, mientras que otros nuevos se llevarán adelante luego de la aprobación de este proyecto.

El tipo de uso de suelo relacionado con los ambientes acuáticos se determinará a través de sistema de información geográfica (Q-Gis; ArchGis), con el objetivo de medir la proporción de área superficial ocupada por ambientes naturales, agrícola-ganaderos y urbanos. Luego de determinados los ambientes se realizarán muestreos exploratorios en estos sitios y se tomarán muestras de agua y sedimentos con el objetivo de medir concentraciones de nutrientes, plaguicidas y metales. Las muestras serán tomadas, conservadas y transportadas al laboratorio de acuerdo a las indicaciones de los analistas. Una vez en INALI, serán conservadas a 4°C hasta su transporte a los laboratorios de análisis. Los análisis de plaguicidas serán realizados por el personal del PRINARC (FIQ – UNL), mientras que los análisis de metales serán realizados en INTEC (CONICET – UNL). Se registrará in situ la temperatura del agua, oxígeno disuelto, pH, conductividad y altitud mediante sensores digitales (HANNA instruments, Woonsocket, RI, USA). Además, se tomarán muestras de la vegetación presentes en los cuerpos de agua y se estimará el porcentaje de cobertura vegetal. Las especies vegetales se determinarán en INALI, utilizando claves taxonómicas. La información sobre las precipitaciones (medias estacionales) de cada



sitio será extraída de la base de datos “Datos Climáticos Mundiales” (Datos Climáticos Mundiales. <https://es.climate-data.org/>) y de la Facultad de Ciencias Hídricas (FICH – UNL).

Una vez obtenidos los resultados de los análisis de plaguicidas y metales se calculará el índice de riesgo ecológico (ERA, por sus siglas en inglés), de acuerdo a Iturburu et al. (2019). Los valores de este índice serán utilizados para determinar el gradiente de impacto recibido en los diferentes ambientes acuáticos. La variables de calidad de agua y de concentración de agroquímicos serán analizadas mediante análisis de componentes principales (ACP) y análisis de escalamiento no métrico (AENM) (comúnmente llamado NMDS por sus siglas en inglés). Estos análisis permitirán establecer los patrones de similitud ambiental entre los sitios y serán utilizados como información de base para interpretar los patrones de respuesta de los biomarcadores biológicos de estrés de los organismos acuáticos a la alteración ambiental.

#### Colecta de material biológico

Los especímenes de las especies dominantes de decápodos, anfibios y peces, serán recolectados de los cuerpos de agua con red de mano, con la cual se explorará tanto zona limnética como la litoral y también bajo rocas y/o sustratos artificiales. Si bien no se puede a priori establecer que especies serán utilizadas, ya que tienen que ser especies que estén representadas en todos los ambientes a evaluar, se propone tentativamente a *Macrobracium borellii*, *Zilchiopsis collastinensis*, *Trichodactylus borellianus* entre los decápodos, *Leptodactylus latrans* o *Rhinella arenarum* en el caso de los anfibios y *Astyanax rutilus* en el caso de los peces. Luego los ejemplares serán transportados vivos al laboratorio, con agua del ambiente natural, donde se los aclimatará antes de ser procesados. El procesamiento de los organismos se llevará a cabo durante el mismo día o el día siguiente de la recolección. Se les acondicionará con oxígeno y condiciones de refugio (rocas o refugios artificiales) con el fin de reproducir las condiciones naturales y evitar situaciones de estrés, asegurando los resultados finales de las determinaciones. El procesamiento incluye la determinación de especie, en el caso de no poder hacerse en el campo, medición de largo y ancho, peso húmedo y sexo, utilizando claves taxonómicas, calibres digitales y balanza de precisión. En el caso de los decápodos, el sexo será determinado por la presencia o ausencia de pleópodos modificados, para el caso de los aeglidos (Martín y Abele, 1988), mediante la presencia o ausencia del apéndice masculino en camarones (morfología del endopodito del segundo par de pleópodos) (Pinheiro y Hebling, 1998) y mediante la observación del abdomen en los cangrejos brachiuros (Melo, 2003). Luego de esto, se realizará la anestesia de los animales hasta su muerte o completa inmovilidad (a través de crioanestesia en el caso de los decápodos o de la utilización de anestésicos en el caso de los peces y los anfibios) y la disección de los tejidos. En el caso de los peces, la determinación sexual se realizará mediante la observación de los órganos reproductivos. Se extraerán muestras de hígado o hepatopáncreas, músculo y/o branquias, dependiendo del grupo zoológico, o se utilizarán individuos completos en el caso de los anfibios. Las muestras serán rápidamente enfriadas en nitrógeno líquido y conservadas en ultra freezer a -80°C hasta su posterior procesamiento. La determinación sexual no se realizará en el caso de los anfibios ya que se trabajará con larvas.

#### Determinación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo.

Las muestras de tejidos se homogeneizarán en buffer fosfato 0,1M (pH 6,5), conteniendo glicerol 20%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y dithioerythritol (DTE) 1,4 mM. El homogeneizado se centrifugará a 20000g (4°C) durante 30 min, y el sobrenadante será guardado a -80°C hasta las determinaciones enzimáticas Wiegand et al. (2000). Las actividades enzimáticas se determinarán espectrofotométricamente. La actividad de glutatión S-transferasas (GST, EC 2.5.1.18), siguiendo la conjugación de GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) usado como sustrato, se determinará según Habig et al. (1974). La actividad de la glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2) se establecerá de acuerdo a Tanaka et al. (1994). Para la medición de la actividad del glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) se seguirá la técnica de Drotar et al. (1985), usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato. La actividad de la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) se determinará según Beutler (1982). En todos los casos cada muestra se medirá por triplicado. Las proteínas totales se determinarán de acuerdo a Bradford (1976) usando albúmina bovina como estándar y la actividad enzimática se calculará en nanokatal por miligramo de proteína. La LPO se determinará mediante la medición de la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), como el malonildialdehído formado durante la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Oakes, 2003). Los tejidos serán homogeneizados individualmente con solución de cloruro de potasio 0,15 M. 1 ml y se incubarán durante 1 hora a 37° C en agitación continua. Posteriormente se agregará 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y 1 ml de TBA al 0,67% a cada muestra. Se colocará en baño a 95°C durante 30 minutos y se enfriará en hielo durante 10 minutos. Cada vial será centrifugado a 3000 g durante 10 min, y se medirá el contenido de TBARs en el sobrenadante por espectrofotometría ( $\lambda$  abs:



532 nm). El contenido de TBARs se expresará como nanomoles/ mg de tejido húmedo usando el coeficiente de extinción molar de  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . El contenido de peróxido de hidrógeno se cuantificará por espectrofotometría de acuerdo con Bellincampi et al. (2000). Este método se basa en la oxidación del peróxido mediada por  $\text{Fe}^{2+}$ , seguido por la reacción de  $\text{Fe}^{3+}$  con naranja de xilenol (o-cresolsulfonephthalein 3', 3''bis (methylimino) ácido diacético, sal de sodio). El contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se calculará en base a una curva estándar. La actividad de la acetilcolinesterasa se realizará de acuerdo a Ellman (1961), utilizando acetiltiocolina como sustrato.

Las muestras de músculo destinadas para el análisis de ácidos grasos serán homogeneizadas y pesadas (20 a 70 mg). Luego se seguirá el protocolo implementado por Ramalhosa et al. (2012) para extraer lípidos totales y a las muestras obtenidas se les realizará el agregado de catalizadores y se analizarán con un cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas (GC Agilent Technologies modelo 5977B, CURE, Uruguay). Los ácidos grasos serán reportados como porcentajes del total de ácidos grasos (% Total de ácidos grasos, mean  $\pm$  SD) y agrupadas como saturadas, monoinsaturadas, poliinsaturadas y esenciales.

#### Análisis estadístico

Se realizarán análisis estadísticos paramétricos y/o no paramétricos (dependiendo de la distribución de los datos o de los supuestos de los modelos que serán evaluados previamente). Por ejemplo, los análisis considerados serán correlaciones, test de medias, modelos lineales simples y modelos mixtos generalizados (GLMM) entre otros. Se usaran modelos estadísticos univariados para comparar la suma total ( $\Sigma$ ) de ácidos grasos saturados (AGSI), ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), n-3 y n-6 (AGPI), así como las proporciones de AGSI: AGPI, n-3: n-6 y ácido palmítico: AGPI, los cuales se utilizarán como indicadores del estado fisiológico y nutricional de las poblaciones en cada uno de los ambientes. Se realizarán análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) y análisis de componentes principales (PCA) para evaluar cuáles fueron los parámetros relacionados con el estrés oxidativo y los tipos de ácidos grasos más influenciados por el estrés ambiental. Además, se calcularán coeficientes de correlación para determinar las relaciones entre los índices de riesgo ecológico, concentraciones de nutrientes, agroquímicos y/o metales y los perfiles de ácidos grasos obtenidos en los organismos bajo estudio. Todos los Análisis estadísticos se harán utilizando diferentes paquetes del lenguaje R (2018) (R Development Core Team (2018) (R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna).

**– 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)**

	<b>NO X</b>
	<b>SI. Elija una de las opciones:</b>
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.

**– 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".

	<b>1 (UN) año</b>
	<b>2 (DOS) años</b>
	<b>3 (TRES) años</b>
	<b>4 (CUATRO) año</b>
	<b>5 (CINCO) años X</b>
	<b>Otro.</b>
	<b>Motivos: El tiempo que demorará la selección de sitios de muestreo, colecta de animales, procesamiento de las muestras y de los datos y la publicación de los resultados en revistas indexadas llevará alrededor de ese tiempo, ya que la actividad continuará una vez finalizado este proyecto. Por eso se pide esa cantidad de tiempo, para poder publicar los resultados.</b>

Dr. Carlos Leandro Negro