

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE ENTRENAMIENTO

PERIODO 2015/2016

1. APELLIDO: *González Núñez*

NOMBRES: Ayelén Anahí

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: Moreno *CP:* 1744 *Tel:*

Dirección electrónica (donde desea recibir información): aye.gonzaleznunez@live.com.ar

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Aplicación de biomarcadores genotoxicos en *Cnesterodon decemmaculatus*

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:*

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:*

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Lujan

Facultad:

Departamento: Ciencias Básicas

Cátedra:

Otros: Laboratorio de Ecofisiología Aplicada (PRODEA)

Dirección: Calle: Ruta 5 y Avenida Constitucion *N°:* -

Localidad: Luján *CP:* 6700 *Tel:* 02323 423171

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Ossana Natalia Alejandra

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CABA *CP:* 1416 *Tel:*

Dirección electrónica: natyossana@gmail.com

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

En este período fui entrenada en las técnicas analíticas, genotóxicas y estadísticas, requeridas para el desarrollo del trabajo, para lo cual inicié mi aprendizaje en las mismas. Trabajé con muestras ambientales y material biológico (peces).

Las tareas desarrolladas durante el año de Beca estuvieron orientados a investigar los efectos producidos por la contaminación sobre peces adultos de *Cnesterodon decemmaculatus*. Se utilizaron como punto final de efecto biomarcadores genotóxicos: test de micronucleos (MN) y ensayo cometa (EC) en eritrocitos de sangre periférica.

Para la aplicación de estas técnicas durante este año fui entrenada y adquirí conocimientos relacionados a:

- la disección de animales y la toma de muestras.
- tinción y observación de las mismas al microscopio óptico y de fluorescencia.
- preparación de los reactivos necesarios.
- manejo de herramientas informáticas (software de fotografía Axio Vision y estadístico Infoestat).

Participo de dos ensayos realizados en el marco de un PICT que se está desarrollando en el laboratorio del Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA) (PICT 1207/2012 - PRESTAMO BID 1728/OC-AR). En ellos se evaluó el efecto producido por la muestra ambiental tomada en la naciente del río Reconquista y la contaminación por Cadmio como tóxico de referencia. Para ello se expusieron a los animales durante 12 días a cada tratamiento y se evaluaron los mismos biomarcadores luego de 24 días de recuperación en medio libres de contaminación. Como control negativo se utilizó agua moderadamente dura (MHW) y como control positivo de genotoxicidad Ciclofosfamida. Mi participación en estos ensayos estuvo abocada principalmente a la disección de los animales, extracción de sangre y preparación de los frotis para la realización de ambas técnicas. Sin embargo también adquirí conocimientos relacionados a otras tareas que se realizaban en el laboratorio durante el período del ensayo: mantenimiento de bioterio, recolección de individuos, manejo de instrumentos de laboratorio y medición de parámetros físicoquímicos de las muestras de agua y ambientales (pH, dureza, conductividad, oxígeno disuelto) y preparación de posters para congresos.

Algunos de los resultados obtenidos de estos ensayos fueron presentados en el Congreso Argentina y Ambiente 2015 (Gonzalez Nuñez AA, Ossana NA, Baudou FG, Soloneski S, Ferrari L - Evaluaciones genotóxicas en *Cnesterodon decemmaculatus*. Argentina y Ambiente 2015, II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental, del 1° al 4 de Diciembre p 69 (ISBN 978-987-46096-0-1)).

También realicé un ensayo con Ibuprofeno para evaluar su efecto genotóxico en la misma especie. El ibuprofeno es uno de los agentes antiinflamatorios, antipirético y analgésico más utilizado mundialmente. La presencia de este contaminante emergente en cuerpos de agua urbanos y periurbanos, ha sido informada en nuestro país en un número de ambientes acuáticos, como resultado de las descargas domésticas e industriales. Para este ensayo se utilizaron 21 adultos que fueron expuestos durante 12 días a una concentración subletal, con sus respectivos controles positivos y negativos. Los resultados obtenidos en este ensayo fueron enviados como resumen al IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC) que se realizará en Octubre de 2016 en la ciudad de Córdoba.

En ambos ensayos, se determinó la cantidad de aberraciones nucleares (AN) y MN según el protocolo propuesto por Lajmanovich y col. (2014) y Vera-Candioti y col. (2010). Se extrajo sangre de los individuos expuestos, se realizó un frotis, se fijó en metanol y se tiñó con Giemsa (5%, 15 min). Se realizaron las lecturas de las muestras en microscopio óptico y se tomaron imágenes con el programa Axio Vision. Se contabilizó la cantidad de MN y las AN considerando las categorías: muesca, escotadora, buds, doble núcleo. Se contabilizó en un total de 1500 células por muestra y se realizó el análisis estadístico (Infostat).

Para el Ensayo Cometa se siguió el protocolo propuesto por Singh y col. (1988) y Vera-Candioti y col. (2013). Según el cual se extrae una gota de sangre en 1 ml de PBS, se centrifuga y el pellet se resuspende con agarosa. Las células se lisaron y se realizó la corrida en buffer pH 13 a 25 mV y 250 mA. Al momento de observación al microscopio de fluorescencia se tiñó con DAPI y se clasificó el daño (clase 0-IV) en 100 células. Se calculó el índice de daño genético (IDG) y se evaluó estadísticamente mediante ANOVA o Kruskal Wallis con test a posteriori Tukey o Dunn.

Finalmente también realicé pruebas para poner a punto la técnica de MN en branquias de *Cnesterodon decemmaculatus* según Takai y col. (2004). Aún no se han obtenidos buenos resultados por lo cual se pretende continuar en la puesta a punto de la técnica.

Bibliografía citada:

Lajmanovich RC, Cabagna-Zenklusen MC, Attademo AM, Junges CM, Peltzer PM, Bassó A, Lorenzatti E (2014) Induction of micronuclei and abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mut Res* 768:7-12

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191

Takai A, Kagara N, Fujikawas K (2004) Susceptibility of male and female medaka (*Oryzias latipes*) fish to spontaneous and X-ray induced micronucleus formation in gill cells. *Mut Res* 558: 131-136

Vera Candioti JV, Soloneski S, Larramendy ML (2010) Genotoxic and cytotoxic effects on the formulated insecticide Aficida® on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae). *Mutat Res* 703:180-186.

Vera Candioti JV, Soloneski S, Larramendy ML (2013) Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 98:368-373

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN.
(Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN.
(Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

2015- Gonzalez Nuñez AA, Ossana NA, Baudou FG, Soloneski S, Ferrari L Evaluaciones genotóxicas en *Cnesterodon decemmaculatus*. Argentina y Ambiente 2015, II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental, del 1° al 4 de Diciembre p 69 (ISBN 978-987-46096-0-1)

2016- Gonzalez Nuñez AA, Ossana NA, Eissa BL, Ferro JP, Ferrari L, Salibian A. Evaluación genotóxica del Ibuprofeno en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus*. IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC, Capítulo Argentino). (Enviado)

2016- Ferro JP, Eissa BL, Ossana NA, Gonzalez Nuñez AA, Ferrari L, Salibián A, Berneri MJ, Mastrantonio G. Evaluación del comportamiento natatorio de *Cnesterodon decemmaculatus* en bioensayos de exposición a Ibuprofeno. IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC, Capítulo Argentino). (Enviado)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

2015- Gonzalez Nuñez AA, Ossana NA, Baudou FG, Soloneski S, Ferrari L Evaluaciones genotóxicas en *Cnesterodon decemmaculatus*. Argentina y Ambiente 2015, II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental, del 1° al 4 de Diciembre p 79 (ISBN 978-987-46096-0-1). Trabajo presentado en la modalidad de poster.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

Profesora en Secundaria Básica (3er año Biología y Físicoquímica, 2do año Físicoquímica) Colegio Nido de Águilas, Moreno, Bs As.

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

Cursando Ingles 6to nivel, Universidad Nacional del Oeste.

14. TÍTULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Biomarcadores de genotoxicidad en peces adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a muestras ambientales y tóxicos de referencia.

Se analizarán los efectos provocados por una muestra ambiental de la cuenca alta del río Reconquista (RR) y la exposición a un metal pesado (Cadmio, Cd) así como también al Ibuprofeno (Ibu), un contaminante emergente que es un analgésico de amplio uso.

El Cd ha sido encontrado en nuestros ríos en concentraciones superiores a los niveles guía para la protección de la vida acuática (Rigacci et al., 2013) y es utilizado como tóxico referente para esta y otras especies (Ossana et al 2016; de la Torre, 2001; Eissa, 2009; Mastrángelo y Ferrari, 2013). Los fármacos, como el Ibu, son producidos y utilizados por las poblaciones en cantidades que exceden, en muchos casos, los cientos de toneladas anuales (Halling-Sorenson et al., 1998) y el 30 al 90% de las dosis administradas de fármacos ingeridos por humanos son excretados en la orina como sustancias activas. La descarga de estos por efluentes en los cursos de agua urbanos y periurbanos, resulta en una exposición crónica de los organismos acuáticos a estos compuestos con impactos desconocidos sobre ellos (Elorriaga et al 2013 a, b; Valdes et al. 2014).

Sobre la base de los conocimientos adquiridos durante el primer año de beca, en relación a la metodología de biomarcadores de genotoxicidad en sangre periférica en un pez nativo (*Cnesterodon decemmaculatus*), el objetivo de este segundo año de Beca es, relizar dos nuevos ensayos que permita realizar comparaciones múltiples en las respuestas encontradas en el RR y con los tóxicos de referencia,. Cuantificar, describir y fotografiar la inducción de micronúcleos y los distintos tipos de aberraciones nucleares halladas. Aplicar índices. Realizar su tesina de licenciatura.

El cronograma de Actividades es el siguiente:

- Un ensayo correspondiente a la estación climática de verano, para lo cual se tomaran muestras de agua de la cuenca alta del río Reconquista (RR) y se expondran animales durante 12 días a este medio. Los ensayos constan de una aclimatación en MHW (agua moderadamente dura) y una exposición por 12 días a: 1) RR; 2) MHW + Cd subletal (Tóxico de referencia); 3) MHW + Ciclofosfamida (control positivo de genotoxicidad); 4) MHW (control negativo)
- Un ensayo de 12 días de exposición a Ibuprofeno en una concentración menor a la ya ensayada y ambientalmente relevante. Los ensayos constan de una aclimatación, exposición durante 12 días con controles negativos y positivos de genotoxicidad.
- Recuento y observación al microscopio.
- Toma de microfotografías de los preparados con el programa AxioVision.
- Analisis estadístico.
- Escritura y redacción de comunicaciones a congresos, manuscritos y Tesis de Licenciatura.

Bibliografía:

- de la Torre FR (2001) Estudio integrado de la contaminación acuática mediante bioensayos y parámetros fisiológicos y bioquímicos indicadores de estrés ambiental. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, p. 283
- Eissa BL (2009) Biomarcadores comportamentales, fisiológicos y morfológicos de exposición al cadmio en peces pampeanos. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, p. 209
- Elorriaga Y, Marino DJ, Carriquiriborde P, Ronco A.E. (2013, a). Human Pharmaceuticals in Wastewaters from Urbanized Areas of Argentina. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 90 (1): 397-400.
- Elorriaga Y, Marino DJ, Carriquiriborde P, Ronco A.E. (2013, b). Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. International Journal of Environment and Health, 6 (4): 330 - 339.
- Halling-Sorenson B, Nielsen SN, Lansky PF, Ingerslev F, HoltenLutzhof HC, Jorgensen SE (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. Chemosphere 36:357-393
- Mastrángelo M, Ferrari L (2013) *Cnesterodon decemmaculatus* juveniles as test organisms in toxicity assessment: Cadmium case. 91 (1): 49-54
- Ossana NA, Eissa BL, Baudou FG, Castañé PM, Soloneski S, Ferrari L (2016) Multibiomarker response in ten spotted live-bearing fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. Ecotoxicol Environ Saf 133: 73-81
- Rigacci LN, Giorgi ADN, Vilches CS, Ossana NA, Salibián A (2013) Effect of a reservoir in the water quality of the Reconquista River, Buenos Aires, Argentina. Environ Monit Assess 185:9161-9168
- Valdés ME, Amé MV, Bistoni MA, Wunderlin DA. (2014). Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquia River basin (Córdoba, Argentina) Science of the Total Environment, 472: 389-396.

Condiciones de Presentación

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:
 - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
 - c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario