



*Universidad Nacional de Río Cuarto*  
*Facultad de Cs. Exactas, Físico-Químicas y Naturales*

**VISTO** la propuesta de Protocolo de Trabajo entre la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto (FCEFQyN) y la Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales de la Universidad Juan Agustín Maza, obrante en el Expediente N° 106316-1; y

**CONSIDERANDO:**

Que dicho Protocolo de Trabajo se encuadra en el Convenio aprobado por Resolución del Consejo Superior N° 367/12 (Exp. N° 106316).

Que la FCEFQyN, a través del Departamento de Ciencias Naturales y la Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales fortalecerán sus vínculos educativos como comunicados profesionales y académicas, a través del intercambio de experiencias y del trabajo colaborativo y solidario.

Que se impulsará un conjunto de acciones dirigidas para dar continuidad, mejorar y potenciar el conocimiento del efecto de los plaguicidas de uso agrícola sobre la salud del hombre la salud animal y ambiental.

Que por parte de la FCEFQyN se designa como coordinador de las actividades a la Dra. Delia Aiassa del Departamento de Ciencias Naturales y como Coordinador por parte de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales a la Dra. Nora B. Gorla.

Que el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, al examinar el presente Protocolo expresa que para su análisis requiere de documentos y especificaciones necesarios para la evaluación del mismo.

Que la Coordinadora por parte de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales presenta explicaciones al respecto, las cuales fueron incorporadas al presente Expediente.

Que se cuenta con el dictamen favorable de la Dirección de Asuntos Jurídicos N° 7128 y, que desde el punto de vista jurídico, señala que no hay objeción legal que formular al mismo.

Que atento al plazo de duración, deberá ser autorizado por el Consejo Superior.

Que el mismo cumple con los requisitos establecidos en las reglamentaciones vigentes.



*Universidad Nacional de Río Cuarto*  
*Facultad de Cs. Exactas, Físico-Químicas y Naturales*

Que se ha realizado al respecto un informe del ViceDecano y, luego de constituirse el Consejo Directivo en comisión, se ha abordado y analizado el tema en tratamiento sobre tablas.

Por ello y en uso de las atribuciones conferidas por el Artículo 32 del Estatuto de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

**EL CONSEJO DIRECTIVO**  
**DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,**  
**FISICO-QUIMICAS Y NATURALES**

**RESUELVE:**

**ARTÍCULO 1ro.-** Aprobar el Protocolo de Trabajo entre la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto (FCEFQyN) y la Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales de la Universidad Juan Agustín Maza de Mendoza, según se detalla en ANEXO de la presente.

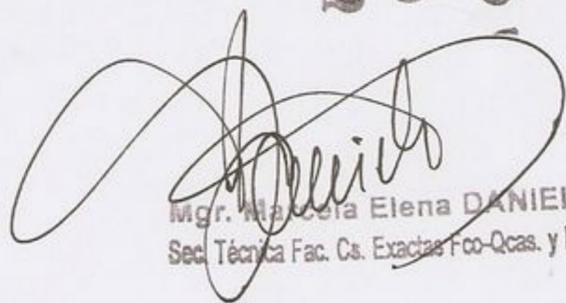
**ARTICULO 2do.-** Elevar la presente Resolución para su tratamiento en el Consejo Superior.

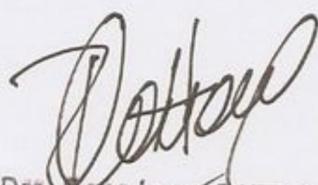
**ARTICULO 3ro.-** Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento las Áreas de competencia. Cumplido, archívese.

**DADA EN LA SALA DE SESIONES DEL CONSEJO DIRECTIVO DE ESTA FACULTAD A LOS DIECINUEVE DIAS DEL MES DE SEPTIEMBRE DEL AÑO DOS MIL TRECE.**

RESOLUCION Nro.:

280

  
Mgr. Marcela Elena DANIELE  
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.

  
Dra. Rosa Irene CATTANA  
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.



**A N E X O**

**PROTOCOLO DE TRABAJO**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES  
y  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y AMBIENTALES,  
UNIVERSIDAD JUAN AGUSTÍN MAZA**

En el marco del convenio aprobado por Resolución de Consejo Superior N° 367 Exp. N° 106316, entre la Universidad Nacional de Río Cuarto y la Universidad Juan Agustín Maza (Mendoza) se estipula el presente protocolo entre La FACULTAD de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, en adelante "La FACULTAD de Exactas", con domicilio en Ruta Nacional 36 Km. 601 de la ciudad de Río Cuarto, representada en este acto por la Señora Decana, Dra. Rosa CATTANA, por una parte y por la otra La FACULTAD de Ciencias Veterinarias y Ambientales en adelante "La FACULTAD de Veterinaria", con domicilio en Avda. de acceso este lateral sur n° 2245, San José, Guaymallén, Mendoza, representado en este acto por Sr. Decano Méd.Vet. Guillermo GIAMBASTIANI, el cuál se regirá por las siguientes cláusulas.

**PRIMERA:** La FACULTAD de Exactas a través del Departamento de Ciencias Naturales y la FACULTAD de Veterinaria a través del área de Ciencias Básicas desarrollarán actividades para lograr los siguientes objetivos:

**Objetivos generales**

- ✓ Fortalecer ambas instituciones educativas, como comunidades profesionales y académicas, a través del intercambio de experiencias y del trabajo colaborativo y solidario.
- ✓ Impulsar un conjunto de acciones dirigidas a dar continuidad, mejorar y potenciar el conocimiento del efecto de los plaguicidas de uso agrícola sobre la salud del hombre, la salud animal y ambiental.



**Objetivos específicos:**

- ✓ Realizar estudios de toxicidad reproductiva *in vitro* de los herbicidas e insecticidas más usados en nuestro país
- ✓ Realizar estudios de daño genético en animales domésticos en contacto con insecticidas y antiparasitarios de uso agrícola y/o ganadero
- ✓ Realizar estudios de análisis de riesgo en trabajadores rurales en contacto con plaguicidas mediante trabajos colaborativos, redes de intercambio para promover la participación y apoyo no sólo para la difusión de las experiencias sino para fomentarlas, extenderlas y favorecer su transferencia a otras instituciones educativas.

**SEGUNDA:** Para obtener los resultados mencionados en la cláusula primera, se estructurará un Programa de Trabajo de 36 (treinta y seis) meses de duración y cuyas actividades se detallan en el ANEXO I que forma parte integrante del presente protocolo.

**TERCERA:** El proyecto de trabajo corresponde tipológicamente a un proyecto de carácter académico y científico. Los aspectos específicos de este Protocolo de Trabajo, en lo que concierne a materiales, procedimientos metodológicos, relevamiento de muestras, y valoración de resultados son presentados en detalle en el ANEXO I.

**CUARTA:** Para el logro de los objetivos arriba mencionados, la "FACULTAD de Exactas" y La "FACULTAD de Veterinaria" aportarán personal, infraestructura y equipamiento según lo especificado en el ANEXO II.

**QUINTA:** Las partes tienen la facultad de controlar y verificar la evolución de las actividades programadas.

**SEXTA:** Las partes garantizan la observancia de las normas sobre secreto profesional y la confidencialidad de la información de conformidad con las disposiciones legales por parte de todas las personas que participan de la actividad, motivo del presente protocolo.

**SEPTIMA:** Por parte de la "FACULTAD de Exactas" designa como Coordinador de las actividades a la Dra. Delia Aiassa del Departamento de Ciencias Naturales y como Coordinador por parte de la "FACULTAD de Veterinaria" a la Dra. Nora Bibiana María Gorla del área de Ciencias Básicas.



**OCTAVA:** La FACULTAD de Veterinaria" designa como investigadores participantes del presente protocolo al grupo de investigación de la Dra. Gorla y la "FACULTAD de Exactas" designará al grupo de investigación que dirige la Dra. Delia Aiassa.

**NOVENA:** Los documentos y/o proyectos que se elaboren, sean parciales o definitivos, como resultado de las tareas realizadas en el marco del presente protocolo, serán de propiedad intelectual, por partes iguales, de la Univeridad Maza y de la Universidad Nacional de Río Cuarto, y cuando los signatarios lo consideren conveniente, inscribirán tales derechos.

**DECIMA:** En toda circunstancia o hecho que tenga relación con este Protocolo, las partes tendrán la individualidad y autonomía de sus respectivas estructuras técnicas, académicas y administrativas y asumirán particularmente, por lo tanto, las responsabilidades consiguientes.

**DECIMA PRIMERA:** Este Convenio tiene vigencia a partir de su firma y regirán por el plazo dispuesto en la CLAUSULA SEGUNDA.

Cualquiera de las Partes podrá rescindir el presente acuerdo en cualquier momento, mediante notificación por escrito cursada a la otra parte con una antelación mínima de 30 (treinta) días corridos a la efectiva rescisión.

**DECIMA SEGUNDA:** Ambas partes acuerdan que por cualquier contingencia derivada del presente acuerdo, se someten a los Tribunales Federales de la ciudad de Río Cuarto, y constituyen como sus domicilios especiales los consignados para cada uno de ellos.

En prueba de conformidad se firman tres ejemplares de un mismo tenor y a un solo efecto, en la ciudad de Río Cuarto, a los .....días del mes de ..... del año .....

  
Mgr. Marcela Elena DANIELE  
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas-Fco-Qcas. y Nat.

  
Dra. Rosa Irene CATTANA  
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.



## ANEXO I

### DAÑO POTENCIAL DE PLAGUICIDAS DE USO AGRÍCOLA SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO Y LA REPRODUCCIÓN

#### Diseño de estudio:

El diseño metodológico es de carácter exploratorio y descriptivo, con una aproximación cualitativa.

#### Estudios genéticos:

--*Ensayo de maduración in vitro de ovocitos bovinos*: En este estudio se evalúa el efecto adverso potencial de las formulaciones a testear en el proceso de maduración después de la exposición de los complejos ovocito-cúmulus a las mismas, con especial referencia a los cambios morfológicos entre los ovocitos expuestos y los no expuestos. El logro exitoso de la maduración *in vitro* (reanudamiento de la meiosis hasta metafase II) es el blanco toxicológico del ensayo (Lazzari et al., 2008; Luciano et al., 2010). Maduración de ovocitos bovinos: los ovarios bovinos se obtienen de hembras en frigorífico, durante la inspección veterinaria de rutina. Los ovarios se transportan en PBS estéril a 25 °C, dentro de las 4 horas del sacrificio de los animales. Los ovocitos inmaduros se recuperan por aspiración de folículos de  $\geq 3$ mm de diámetro en medio de cultivo celular M 199 suplementado con HEPES (20 mM), alcohol polivinílico (PVA) (1 mg/ml) y heparina (10  $\mu$ g/ml). Se seleccionan los complejos cúmulus-ovocitarios con al menos 3 capas intactas de células de la granulosa. Se lavan 2 veces en medio de recolección y se transfieren al medio de maduración, un promedio de 15–20 ovocitos por muestra en 0,5 ml de medio de maduración en el cual se disuelven los compuestos químicos a ensayar. La maduración se completa en 24 horas de cultivo a 38,5 °C con 5% CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad. El blanco toxicológico que se evalúa en este ensayo de maduración *in vitro* de ovocitos es la reanudación de la meiosis hasta el estadio de metafase II que se alcanza después de 24 horas de cultivo *in vitro*.



Los resultados son expresados como el porcentaje de ovocitos en metafase II sobre el número total de ovocitos cultivados en medio de maduración.

--*Ensayo de fertilización in vitro*: se evaluará el efecto adverso potencial de las sustancias testeadas en el proceso de penetración de los espermatozoides bovinos capacitados dentro de los ovocitos maduros y sobre la formación de los pronúcleos femenino y masculino. Deben observarse tanto la penetración de los espermatozoides como la formación de los pronúcleos para identificar el blanco toxicológico más predictivo (Lazzari et al., 2008; Luciano et al., 2010). Este procedimiento consiste en el proceso de fertilización in vitro de ovocitos bovinos, previamente madurados in vitro, por medio de una co-incubación con semen de toro congelado. Para la preparación del semen se usa un gradiente de densidad discontinuo de percoll (45% sobre 90%): se diluye 1 ml de 90% de percoll y 1 ml de TALP libre de  $Ca^{2+}$  y 2 ml de percoll son adicionados por debajo. Los ovocitos son colectados del medio de maduración y parcialmente desnudados de las células del cúmulus con 5  $\mu$ l/ml de solución de hialuronidasa (0,025 mg/ml) en medio HEPES-SOF bufferado. Los ovocitos, en grupos de 20, son transferidos a placas de 4 pocillos que contienen 300  $\mu$ l de la suspensión de espermatozoides diluidos en medio de fertilización en presencia de los compuestos químicos a testear en las dosis apropiadas para cada sustancia. Los ovocitos y el semen son incubados a 38,5 °C durante 24 horas en atmósfera humidificada y 5%  $CO_2$ . Los presuntos cigotos son recolectados del medio de fertilización, desnudados de las células del cúmulus y fijados en ácido acético: metanol y coloreados con ácido lacmoide. El blanco toxicológico del ensayo de fertilización in Vitro de ovocitos bovinos es la formación completa de los pronúcleos masculino y femenino.

Estos tres ensayos reproductivos in vitro se realizarán en 4 dosis diferentes separadas en un orden de magnitud 1- 0,1-0,01-0,001mg/ml, para los plaguicidas más utilizados en la región centro-oeste.



*-Ensayo cometa en sangre y epitelio de fauces en animales de producción*

Muestreo de sangre y epitelio de fauces para realizar el Ensayo cometa para evaluar genotoxicidad en animales.

Ensayo Cometa: (Singh y col., "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells". Exp. Cell Res. 175, 84- 191, 1988; Moller, "The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures", Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 98, 336-345, 2006)

El ensayo será llevado a cabo utilizando agarosa de bajo punto de fusión y de punto de fusión normal, solución de lisis fría y electroforesis con una solución alcalina. Finalmente se procede a la neutralización de los preparados con una solución de Tris pH 7,5. La tinción de los preparados se realiza inmediatamente antes de su análisis con 50 µl de bromuro de etidio (20 µg/ml). En cuarto oscuro y mediante microscopio de fluorescencia, se fotografían al menos 100 células por tratamiento. Las imágenes obtenidas serán analizadas empleando el software Comet Store 1.5. Las diferencias entre tratamientos serán analizadas a través de un análisis de la varianza (ANOVA). Como post test se empleará el Test de comparación múltiple de Dunnet (Prism, 1997).

Esta actividad comprende una pasantía de investigación recíproca de un alumno de grado para la capacitación en las técnicas que desarrollan uno y otro grupo. Esta actividad, además de aportar a la formación de recursos humanos, en forma cooperativa entre los dos grupos de investigación aportará datos para el uso de animales de producción como bioindicadores de calidad ambiental.

- LAZZARI, G., TESSARO I, CROTTI G, GALLI C, HOFFMANN S, BREMER S, PELLIZZER C. 2008. Development of an in vitro test battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella. Toxicology and Applied Pharmacology 233360-370
- LUCIANO AM, FRANCIOSI F, LODDE V, CORBANI D, LAZZARI G, CROTTI G, GALLI C, PELLIZZER C, BREMEN S, WEIMER D, MODINA SC. 2010. Transferability and inter-laboratory variability assessment of the in vitro bovine oocyte maturation (IVM) test within ReProTect. Reproductive Toxicology 30, 81-88.



*-Análisis de riesgo*

Se implementará un cuestionario que refiera a situaciones de riesgo en el trabajo cotidiano en contacto con plaguicidas de las localidades donde se realicen los estudios genéticos. En el mismo se evaluará en qué medida el peligro representa un riesgo para la sociedad, para el medio físico o para los participantes mismos. En la guía de entrevista se relevarán las siguientes dimensiones: aspectos generales del lugar, grado de exposición a plaguicidas, tipos y usos de plaguicidas, medidas preventivas personales, posibilidades de contaminación ambiental, factores de confusión, posibilidades de exposición aguda por exposición.

La Bioseguridad es una rama de las ciencias que comienza a desarrollarse desde 1993, hasta ese momento no se habían dictado reglamentaciones, se trabajaba sin normas precisas, la OMS comienza desde ese año a expresar la necesidad de su aplicación. Como su nombre indica, la bioseguridad proporciona medios idóneos para evitar accidentes por causas químicas, físicas y biológicas. Se basa en el análisis de riesgos, es decir, la bioseguridad investiga los riesgos o peligros de que se produzcan enfermedades u otro tipo de daños a la salud.

El tema de investigación que nos ocupa, el efecto de los plaguicidas de uso agrícola sobre la salud del hombre, la salud animal y ambiental, está íntimamente relacionado con contenidos de bioseguridad. Conocer los elementos de protección personal que utilizan los trabajadores rurales a los cuales se les efectúan los estudios de genotoxicidad es emplazar el estudio dentro de las medidas de bioseguridad necesarias para esa tarea.

Por otro lado, a los envases de plaguicidas se los considera un residuo peligroso, con posibilidad de contaminación de aguas y suelos, de afectación de otros seres vivos, que también son motivo de preocupación de ambos grupos de investigación.

La discusión en red de los resultados obtenidos permitirá una mejor construcción de la realidad ambiental en referencia a la presencia de plaguicidas.

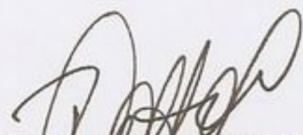


Ausubel reconoce que "la discusión es el método más eficaz y realmente el único factible de promover el desarrollo intelectual con respecto a los aspectos menos bien establecidos y más controvertidos de la materia de estudio" (Ausubel, Novak y Hanesian, 1978).

- AUSUBEL, D. P.; NOVAK, J.; HANESIAN, H. (1978). Psicología Educativa. Un punto de vista cognoscitivo. México: Trillas.
- PAKMAN, M. (1995) "Redes: una metáfora para la práctica de intervención social". En Dabas, E. y Najmanovich, D. (comp) Redes. El Lenguaje de los vínculos. Hacia la reconstrucción y fortalecimiento de la sociedad civil. Buenos Aires: Paidós. Colección Ideas & Perspectivas. Pág. 263.



Mgr. Marcela Elena DANIELE  
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.



Dra. Rosalinda CATTANA  
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.



## ANEXO II

### DAÑO POTENCIAL DE PLAGUICIDAS DE USO AGRÍCOLA SOBRE LA REPRODUCCIÓN

#### APORTES

##### -Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales

La Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales aportará a través del grupo de investigación del Laboratorio de Genética, Reproducción y Ambiente, Universidad Juan Agustín Maza, los recursos humanos, equipamiento e infraestructura para la realización de:

- Estudios de toxicidad reproductiva *in vitro*.  
Estudiar el efecto de los plaguicidas más utilizados en la región centro-oeste de nuestro país sobre el sistema de maduración y fertilización de ovocitos de bovinos (Lazzari *et al.*, 2008; Luciano *et al.*, 2010) y sobre movilidad y morfología de espermatozoides de bovinos *in vitro*.
- Análisis de riesgos en cuanto a bioseguridad.  
Analizar los elementos de protección personal y ambiental que utilizan los trabajadores rurales de la provincia de Mendoza cuando realizan la aplicación de plaguicidas agrícolas o de los mismos principios activos usados en medicamentos veterinarios.

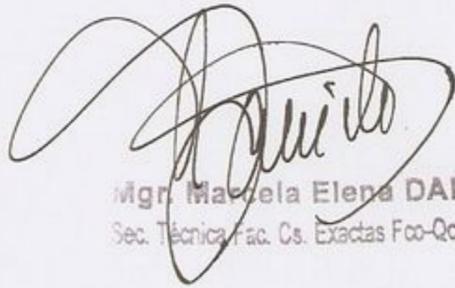
##### -Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

La Facultad de Ciencias Exactas aportará a través del grupo de investigación GeMA (Genética y Mutagénesis Ambiental – Departamento de Ciencias Naturales) los recursos humanos, equipamiento e infraestructura para la realización de:

- La evaluación del nivel de daño genético en animales de producción de establecimientos ganaderos, a través del ensayo cometa en muestras biológicas. -Ensayo Cometa (Singh y col., "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells". Exp. Cell Res. 175, 84- 191, 1988; Moller, "The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures", Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 50, 555-570, 2006).



- Análisis de riesgos en cuanto a bioseguridad.  
Analizar los elementos de protección personal y ambiental que utilizan los trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba cuando realizan la aplicación de plaguicidas agrícolas o de los mismos principios activos usados en medicamentos veterinarios.



Mgr. Marcela Elena DANIELE  
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.

  
Dra. Rosa Irene CATTANA  
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.