

Plan Overview

A Data Management Plan created using DMPTool

Title: Investigação toxicológica, histopatológica, imunológica e endócrina dos efeitos individuais e das misturas dos ingredientes ativos Carbendazim, Fipronil e Ametrina no modelo experimental *Danio rerio*

Creator: Bruno Pereira

Affiliation: Universidade Federal de São Paulo (unifesp.br)

Funder: Digital Curation Centre (dcc.ac.uk)

Funding opportunity number: 61069

Template: Digital Curation Centre

Project abstract:

Os impactos antrópicos em ambientes aquáticos ocasionam a exposição da fauna e flora a inúmeras substâncias, das quais, muitas vezes, desconhecemos seus reais efeitos individuais e em misturas. Dentre os agentes químicos que são constantemente introduzidos no meio ambiente, os agrotóxicos mostram-se relevantes, não só pelas quantidades utilizadas, mas também pela diversidade de produtos registrados e comercializados no Brasil. Entre os testes ecotoxicológicos com peixes, o modelo baseado no Zebrafish tem se tornado popular para avaliação da toxicidade, principalmente por ser um organismo com anatomia, fisiologia e desenvolvimento similares a vertebrados superiores e por ser representativo e reconhecido como modelo em ambientes aquáticos. Portanto este projeto visa utilizar diversos parâmetros, incluindo biomarcadores, para avaliar os efeitos dos ingredientes ativos Carbendazim, Fipronil e Ametrina que representam riscos para a vida aquática e a saúde humana, focando tanto na sua ação individual quanto em misturas. Para isso, este projeto realizará análises voltadas a identificação de alterações histopatológicas no fígado e brânquias, além da possível ação destes agentes como interferentes endócrinos, o seu impacto na resposta imunológica e no desenvolvimento embrionário em *Danio rerio*. Estas análises além de acrescentar um caráter multidisciplinar ao projeto permitirão a produção de dados relevantes para o crescimento do conhecimento da toxicologia ambiental e a identificação de como tais substâncias podem interagir com a biota. Os resultados também poderão contribuir para avaliações de risco ambiental mais precisas para esses ingredientes ativos.

Start date: 07-01-2021

End date: 07-01-2023

Last modified: 03-31-2021

Copyright information:

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

Investigação toxicológica, histopatológica, imunológica e endócrina dos efeitos individuais e das misturas dos ingredientes ativos Carbendazim, Fipronil e Ametrina no modelo experimental *Danio rerio*

Serão coletados dados referentes aos possíveis efeitos dos ingredientes ativos Carbendazim, Fipronil e Ametrina em peixes da espécie *Danio rerio*

Serão avaliados os seguintes parâmetros: alterações patológicas no fígado e brânquias, resposta imune e ação destes agentes como desreguladores endócrinos nos adultos e avaliação de mortalidade, deformações em embriões.

Após a exposição aos agrotóxicos, o fígado e as brânquias serão coletados e analisados por meio de técnicas morfológicas qualitativas e quantitativas como análise do índice de alterações patológicas, análises morfométricas e estereológicas, visando assim identificar a ação destes compostos como agentes causadores de modificações morfológicas e se estas podem ser classificadas como permanentes ou reversíveis, comparando-se aos dados obtidos em nossos experimentos e os disponíveis na literatura.

Serão avaliados parâmetros imunes no muco (pele e brânquia) dos peixes expostos aos agrotóxicos (de forma individual ou em mistura). Portanto, nas amostras recolhidas serão avaliados parâmetros da imunidade inata que poderão ser usados como biomarcadores de toxicidade destas substâncias (**ação realizada com a parceria internacional**).

Após a exposição aos agrotóxicos, os tecidos que compõem o eixo hipotálamo-hipófise-tiroide e órgãos responsivos aos HT como cérebro, coração e serão coletados. A seleção de genes disponíveis do nosso modelo pretende fornecer uma cobertura abrangente do eixo hipotálamo hipófise tiroide (HPT), incluindo genes envolvidos na regulação de retroalimentação negativa, síntese, transporte, (ativação) e ação dos HT nos tecidos descritos que podem ser regulados positivamente ou negativamente nos órgãos alvo (Figura 01). Os transcritos de RNAm que serão avaliados: 1) hormônio liberador de tirotropina envolvido na regulação do eixo HHT (*trh*, expresso no hipotálamo); 2) receptor do hormônio liberador de tirotropina (*thr*), a subunidade beta do hormônio tiroestimulante (*tshb*) e o hormônio do crescimento (*gh*) (expressos na hipófise); 3) e receptor do hormônio estimulador da tiroide (*tshr*), tireoperoxidasas (*tpo*), cotransportador sódio/iodo (*slc5a5*), tiroglobulina (*tg*) e o fator de crescimento semelhante a insulina 1 (*igf1*) (expressos nos folículos da glândula tiroide), 4) transtiretina (*ttr*) que é uma proteína plasmática que transporta HT, e genes regulados pelos HTs como o receptor beta adrenérgico (*adrb2b*), a enzima glicose-6-fosfatase (*g6pca*) e a proteína transportadora de ácidos graxos (*slc27a1a*) (sintetizados no fígado); 5) O RNAm de genes conhecidamente regulados pelos HTs como: do transportador de sódio e potássio dependente de ATP (*atp1a1a.1*), a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2A-*atp2a2a*), fosfolambam (*plb*) e a mioglobina (*mb*) (expressos no coração); 6) Genes expressos no cérebro regulados pelos HTs e com a expressão alterados em situações de injúria: neuroglobina (*ngb*), transportadores de glicose 1 e 3 (*slc2a1b* e *slc2a3a*, respectivamente), neurotrofina 3 (*ntf3*), *sonic hedgehog* (*shha*), *bndf* (brain derived neurotrophic factor); genes expressos relacionados com o estresse oxidativo e a necropotose: *baxa* (BCL2 associated X, apoptosis regulator a), *bcl2l1* (BCL2 like 1), *tp53* (tumor protein p53), *pak2a* (p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2a), *cat* (catalase), *gpx1a* (glutathione peroxidase 1a), *sod1* (Cu/Zn-superoxide dismutase), *ripk1* (receptor interacting serine-threonine kinase 1), *fas* (TNF receptor superfamily, member 6), *tnfrsf1a* (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a); 7) As desidinasas 1, 2 e 3 que estão envolvidas na ativação (*dio1* e *dio2*) e inativação (*dio3*) dos HT, receptores alfa e beta do hormônio tireoidiano (*thr α* e *β*), assim como os transportadores dos HT para dentro da célula MCT 10 (*slc16a10*), MCT8 (*slc16a2*) e OACTP1C (*slco1c1*), o fator induzido na hipóxia (*hif-1 α*) e a citoglobina que é uma proteína que reserva de oxigênio celular (*cygb1* e *2*) (sintetizados pelo o fígado, coração e SNC); 8) Após uma pesquisa da literatura recente sobre os genes usados no controle interno (housekeeping) em Zebrafish selecionamos os seguintes genes: *sep15* (Selenoprotein 15), *g6pd* (Phosphogluconate dehydrogenase) e quando é usado tratamento químico: *rp113a* (Ribosomal protein

L13a) e a *rp1p0* (Ribosomal protein, large, P0). As bibliografias referentes aos genes que serão estudados estão na tabela 02 referentes aos *primers* na seção de Material e Métodos. Os procedimentos de biologia molecular serão realizados no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob responsabilidade do prof, Dr. Rui M. Maciel.

Após a exposição aos agrotóxicos serão avaliados nos ovos recém fertilizados os estágios do desenvolvimento embrionário, a mortalidade e as seguintes alterações morfológicas do embrião: coagulação do ovo; ausência de formação do somito; ausência de separação da cauda do saco vitelínico; edema no saco vitelínico e no pericárdio; deformação espinhal; desenvolvimento ocular incompleto; ausência de pigmentação; atraso na eclosão; lordose; tamanho de cauda e batimentos cardíacos.

Para o planejamento e realização dos experimentos com as misturas de agrotóxicos será empregada a planilha Excel automatizada (ToxCalcMix v. 1.0), desenvolvida na Universidade de Aveiro & CESAM, Portugal (disponível em <https://pydio.bio.ua.pt/public/toxcalcmix>). Essa planilha permite previsão da toxicidade das misturas dos ingredientes ativos de agrotóxicos testados individualmente no modelo *D. rerio* em relação aos modelos adição de concentração e ação independente, além de estimar os desvios de cada modelo (sinergismo/antagonismo; dependente do nível de dose ou dependente da proporção da dose) (**ação realizada com a parceria internacional**).

Para isso serão usados os dados e técnicas descritas nos itens anteriores, comparando-se com os dados do experimento levando-se em consideração os fatores: tempo, concentração, efeitos isolados dos compostos e efeitos das misturas dos compostos.

As publicações em revistas indexadas, por exemplo no *pubmed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), possibilitam que agências regulatórias organizem material para derivar os novos padrões de qualidade ambiental e também estabelecer dose mais seguras dos agrotóxicos de exposição.

Os dados serão inseridos em planilhas do programa Excel, em abas específicas para cada análise realizada, para possibilitar posterior análise estatística em programa específico.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição, assegurando o cumprimento de todos os critérios de bioética.

Os dados gerados são de propriedade da Universidade podendo, porém, ficar disponíveis em bancos públicos após a publicação dos artigos científicos em revistas especializadas. O acesso aos artigos científicos seguirá os critérios das normas de acesso do periódico.

Os dados serão armazenados no sistema de nuvem Google Drive nos computadores pessoais dos pesquisadores envolvidos, e cópias dos conteúdos serão armazenadas em um HD externo.

O acesso ao conteúdo será realizado pelos pesquisadores envolvidos no projeto, através de senha. Os dados poderão ser disponibilizados para todos que tiveram legítimo e comprovado interesse nos dados e solicite acesso a eles.

Todos os dados obtidos serão armazenados, por pelo menos 10 anos, após o final do estudo.

Todos os dados obtidos serão armazenados, por pelo menos 10 anos, após o final do estudo.

Os dados serão compartilhados por meio de apresentações em congressos, pela publicação de artigos científicos e pelo repositório institucional da Universidade Federal de São Paulo.

Os dados poderão ser compartilhados após a publicação dos trabalhos em revistas científicas. É possível que haja alguma restrição no compartilhamento de dados devido o interstício imposto pelo copyright das revistas científicas as quais os dados serão submetidos.

Os pesquisadores envolvidos no projeto, serão responsáveis pelos dados.

Os recursos necessários consistem em amplo acesso a plataformas online que permitam a coleta de documentos e a conexão com os interessados. Será necessário também o auxílio financeiro de uma agência de fomento para a execução deste projeto.
