



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

“Efectos del diclofenac sobre la reproducción y el desarrollo de crustáceos y peces”

Autora: Emilia Colombo

Director: Dr. Enrique Rodríguez

Codirectora: Dra. Yanina Piazza

Director Asistente: Lic. Ariel Calabró

Laboratorio de Fisiología de Crustáceos y
Laboratorio de Ecotoxicología Acuática,

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN,
UBA & IBBEA, UBA-CONICET

Mayo 2024

Índice

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN	
I) La contaminación ambiental.....	5
a. Contaminantes de preocupación emergente.....	5
b. Cómo llegan los compuestos farmacéuticos al ambiente.....	6
c. Los antiinflamatorios no esteroideos.....	8
d. Diclofenac.....	11
Estructura química.....	11
Concentraciones ambientales.....	12
Efectos tóxicos en especies no-blanco.....	15
II) Marco del plan de trabajo.....	19
III) <i>Daphnia magna</i>.....	20
a. Descripción general.....	20
b. Reproducción y desarrollo.....	21
c. Estudios toxicológicos.....	24
IV) <i>Poecilia reticulata</i>.....	25
a. Descripción general.....	25
b. Reproducción y desarrollo.....	27
c. Morfología interna.....	27
d. Estudios toxicológicos.....	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
Hipótesis de trabajo.....	32
Objetivo general.....	32
Objetivos específicos (OE).....	32
MATERIALES Y MÉTODOS	
Fármaco de ensayo.....	33
Modelos biológicos.....	33
1) <i>Daphnia magna</i>	33
Cultivo y mantenimiento de animales.....	33
Soluciones de ensayo.....	34
Selección de las hembras para el ensayo.....	35
Diseño experimental.....	36
Morfometría de las hembras.....	38
Análisis estadístico.....	39
2) <i>Poecilia reticulata</i>	40
Cultivo y mantenimiento de los animales.....	40
Soluciones de ensayo.....	40
Selección de las hembras para el ensayo.....	41

Diseño experimental.....	41
Técnicas histológicas.....	43
1. Fijación.....	43
2. Deshidratación.....	44
3. Inclusión en parafina.....	44
4. Corte en micrótomo de rotación.....	45
5. Desparafinado e hidratación.....	45
6. Coloraciones.....	46
7. Deshidratación.....	47
8. Montaje.....	47
Análisis histológico.....	48
Análisis estadístico.....	48
RESULTADOS	
<i>Daphnia magna</i>	49
Parámetros morfométricos, reproductivos y mortalidad.....	49
Calidad de la progenie.....	53
<i>Poecilia reticulata</i>	56
Parámetros morfométricos y mortalidad.....	56
Observaciones comportamentales.....	56
Histopatología de órganos.....	57
Parámetros reproductivos.....	64
Morfología externa de juveniles.....	64
DISCUSIÓN	
<i>Daphnia magna</i>	66
Parámetros reproductivos.....	66
Parámetros morfométricos.....	67
Calidad de la progenie.....	68
Diseño experimental.....	69
<i>Poecilia reticulata</i>	71
Parámetros morfométricos y mortalidad.....	71
Efectos sobre el comportamiento.....	71
Histopatología de órganos.....	72
Parámetros reproductivos.....	74
Diseño experimental.....	76
CONCLUSIONES	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
AGRADECIMIENTOS	86

Resumen

El fármaco antiinflamatorio diclofenac (DCF), de uso masivo en salud humana y veterinaria, se encuentra dentro de la lista de contaminantes de preocupación emergente debido a que se ha detectado en agua, sedimento y biota de distintas regiones del mundo en niveles que oscilan entre ng/L y µg/L y se han comprobado efectos tóxicos en invertebrados y vertebrados acuáticos, que comprometen su reproducción y desarrollo. En base a estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis se hipotetizó que la exposición subletal subcrónica al fármaco diclofenac, a concentraciones que incluyen valores ecológicamente relevantes, altera la producción y calidad de la progenie en especies representativas de crustáceos y peces, e induce efectos histopatológicos. A fin de poner a prueba esta hipótesis, se utilizaron dos especies acuáticas: el crustáceo cladócero *Daphnia magna* y el pez dulceacuícola *Poecilia reticulata*. Se realizaron bioensayos de exposición a tres concentraciones del fármaco (10, 100 y 1000 µg/L), siendo la menor de ellas ecológicamente relevante. Los crustáceos expuestos al DCF mostraron una disminución significativa de su potencial reproductivo y un aumento significativo de la incidencia de malformaciones en la progenie, a los 16 días de exposición. Los peces expuestos durante 10 semanas mostraron una tendencia hacia una mayor mortalidad, un comportamiento hiperactivo, así como un menor potencial reproductivo y malformaciones de las crías a concentraciones crecientes de DCF. Las alteraciones histológicas en branquias incluyeron desprendimiento del epitelio, aumento de la irrigación, telangiectasia, aumento del número y secreción de células mucosas y fusión de las lamelas secundarias. A nivel hepático se halló una mayor congestión de los hepatocitos, reducción de las vacuolas contenido glucógeno, mayor basofilia del citoplasma y mayor incidencia de espacios intercelulares. Estos resultados en su conjunto indican que existe un riesgo sobre el potencial reproductivo y el desarrollo de la progenie de ambas especies estudiadas, por exposición al DCF. Los parámetros determinados deberían tenerse en cuenta en evaluaciones de riesgo del DCF sobre especies autóctonas, así como períodos de exposición más prolongados, con un enfoque integral de los efectos tóxicos.

Palabras clave: contaminantes de preocupación emergente - fármacos - diclofenac - reproducción - desarrollo - progenie - branquias - hígado - *Daphnia magna* - *Poecilia reticulata*

“EFFECTS OF DICLOFENAC ON REPRODUCTION AND DEVELOPMENT OF CRUSTACEANS AND FISH”

Abstract

The anti-inflammatory drug diclofenac (DCF), widely used in human and veterinary health, is on the list of contaminants of emerging concern because it has been detected in water, sediment and biota from different regions of the world at levels ranging between ng/L and µg/L and toxic effects have been proven in invertebrates and aquatic vertebrates, which compromise their reproduction and development. Based on this background, in the present thesis work it was hypothesized that subchronic sublethal exposure to the drug diclofenac, at concentrations that include ecologically relevant values, alters the production and quality of progeny in representative species of crustaceans and fish, and induces histopathological effects. In order to test this hypothesis, two aquatic species were used: the cladoceran crustacean *Daphnia magna* and the freshwater fish *Poecilia reticulata*. Waterborne exposure was carried out at three concentrations (10, 100 and 1000 µg/L DCF), being the lowest ecologically relevant. Crustaceans exposed to DCF showed a significant decrease in their reproductive potential and a significant increase in the incidence of malformations in their progeny after 16 days of exposure. Fish exposed for 10 weeks showed a tendency toward greater mortality, hyperactive behavior, as well as lower reproductive potential and malformations of the offspring at increasing concentrations of DCF. Histological alterations in gills included epithelial lifting, increased irrigation, telangiectasia, increased number and secretion of mucous cells, and fusion of secondary lamellae. At the liver level, greater congestion of hepatocytes, reduction of vacuoles containing glycogen, greater basophilia of the cytoplasm and greater incidence of intercellular spaces were found. Taken together these results indicate that there is a risk to the reproductive potential and development of the progeny of both species under study caused by exposure to DCF. These studied parameters should be taken into account in DCF risk assessments on native species, as well as longer exposure periods and a comprehensive approach to toxic effects.

Keywords: contaminants of emerging concern - pharmaceuticals - diclofenac - reproduction - development - progeny - gills - liver - *Daphnia magna* - *Poecilia reticulata*

Introducción

I) La contaminación ambiental

a. Contaminantes de preocupación emergente

Los contaminantes de preocupación emergente (CE) constituyen un enorme grupo de compuestos antropogénicos ampliamente presentes en el ambiente. Este grupo está conformado por una gran variedad de compuestos sintéticos utilizados día a día a nivel mundial, tales como medicamentos, plaguicidas, cosméticos, hormonas esteroideas y productos de higiene personal, entre otros (Rasheed y col., 2019). Los CE son liberados continuamente al ambiente y fueron identificados por primera vez en cuerpos de agua dulce hace aproximadamente unos 50 años. Sin embargo, recién en la década de 1990 comenzó a investigarse la contaminación ambiental con CE debido a los avances en las técnicas analíticas (i.e., cromatografías líquida o gaseosa acopladas a espectroscopía de masa, técnicas inmunoanalíticas, ensayos microbiológicos, electroforesis capilar, etc.) que permitieron expandir los límites de detección hasta valores en el orden de los ng/L (Santos y col., 2010; Rasheed y col., 2019). De esta forma, se detectó la presencia de CE en aguas superficiales (ríos, lagos, arroyos, estuarios), agua de mar, aguas residuales, aguas subterráneas y hasta en agua potable en concentraciones de ng/L a µg/L (Sauvé y Desrosiers, 2014; Gomes y col., 2018).

La presencia de CE en el ambiente ha sido frecuentemente asociada con toxicidad, efectos de desorganización endocrina y resistencia a antibióticos (Gomes y col. 2018). Los compuestos farmacéuticos, que en principio están diseñados para generar un cierto efecto en humanos o animales de interés veterinario, podrían producir efectos adversos en organismos no-blanco, ante la exposición crónica a trazas de los fármacos originales o sus principios activos (Wilkinson y col., 2016). Este tipo de compuestos suele poseer el mismo perfil físico-químico: deben ser liposolubles para poder atravesar membranas celulares y además ser persistentes para evitar que el fármaco sea inactivado antes de cumplir con su efecto principal dentro del organismo blanco. Estas características hacen que los medicamentos sean potencialmente bioacumulables y por ende posicionan a los CE como foco de estudios ecotoxicológicos causales de posibles efectos nocivos sobre ecosistemas terrestres y acuáticos (Halling-Sorensen y col., 1998). Como ejemplo de compuesto farmacéutico de preocupación emergente se puede citar al diclofenac (DCF), un antiinflamatorio no esteroideo de uso masivo. Este fármaco ha sido asociado con efectos nocivos en organismos acuáticos, tema que será desarrollado más adelante.

Dentro del espectro de los CE que se han detectado en tejidos y fluidos biológicos, es imperativo mencionar que existen compuestos con potencialidad para interferir con el funcionamiento normal del sistema endocrino de los organismos y así generar efectos adversos a nivel reproductivo, neurológico, inmune y del desarrollo, tanto en humanos como en otros animales (Fisher y Eugster, 2014; Gomes y col., 2018). A tales compuestos se los denomina desorganizadores endocrinos (DE; Evans, 2022). A modo de ejemplo, el octilfenol y el nonilfenol (alquil polietoxilados con uso en varias industrias como emulsionantes y dispersantes), y el bisfenol-A (utilizado en la fabricación de plásticos) han sido definidos como DE en organismos acuáticos por poseer efectos estrogénicos (Laws y col., 2000; Mishra 2013; Meijide y col., 2016; Rodríguez, 2024). En el caso del DCF, se ha propuesto que este fármaco podría actuar como xenoestrógeno en diversos organismos (González-Rey y Bebianno, 2014; Liu y col., 2017).

b. Cómo llegan los compuestos farmacéuticos al ambiente

La primera pregunta que surge cuando se habla de la presencia de contaminantes de origen antrópico tales como medicamentos, plaguicidas y plásticos, es cómo llegaron al ambiente natural. En lo que respecta a los compuestos farmacéuticos de uso humano y veterinario, existen varias vías de ingreso y dispersión. En primer lugar, se podría mencionar la excreción inalterada de los medicamentos ingeridos por vía oral o aplicados por vía dérmica o parenteral. Si bien las sustancias que ingresan a los organismos suelen sufrir un proceso de transformación metabólica, no siempre se transforma la totalidad de la sustancia biodisponible, y una fracción puede ser excretada en su forma original. En el caso de los metabolitos, pueden seguir teniendo el mismo efecto que el compuesto original, potenciarlo o disminuirlo. Una vez excretada, la sustancia se transporta por el agua cloacal hasta las plantas de tratamiento de aguas residuales o, en su defecto, hasta cuerpos de agua donde se liberan directamente los desechos (Santos y col., 2010; Rastogi y col., 2021).

A nivel doméstico existe otra fuente de contaminación que consiste en el descarte de medicamentos vencidos o que no se van a consumir. Cuando estos productos son descartados a la red cloacal, llegan finalmente a las plantas de tratamiento de aguas residuales o bien directamente a los cuerpos de agua. Además, los fármacos suelen ser descartados también en la basura doméstica y esto lleva a que se conviertan a su vez en contaminantes de ecosistemas terrestres (Santos y col., 2010; Rastogi y col., 2021).

Una tercera fuente de contaminación acuática está dada por las aguas residuales de hospitales y de las plantas de producción de medicamentos. Estos efluentes deberían ser

tratados en plantas de tratamiento especializadas con mecanismos específicos de desactivación de cada componente potencialmente tóxico. Sin embargo, no todos los países cuentan con las instalaciones necesarias para el adecuado tratamiento de estas aguas (Sanamdkar y Harne, 2012). Esto conlleva un grave peligro para el ambiente ya que, si los procedimientos son inadecuados o incompletos, se liberan constantemente aguas contaminadas con la potencialidad de causar efectos tóxicos en los ecosistemas marinos y de agua dulce.

Por otro lado, otra fuente de contaminación ambiental involucra prácticas antrópicas tales como la ganadería y la acuicultura, en las que se utilizan medicamentos veterinarios para mantener la salud de los animales criados en cautiverio. Los desechos de estos organismos contienen una cierta proporción de los fármacos originales, sumado a otro porcentaje de los metabolitos derivados, al igual que en humanos. La diferencia es que esos desechos no pasan por un procedimiento de saneamiento en instalaciones especiales, sino que son liberados directamente al ambiente, depositándose en el suelo o percolando hacia aguas subterráneas. Más aún, el estiércol contaminado con fármacos se utiliza como fertilizante en la agricultura, favoreciendo su captación por los vegetales de consumo humano (Santos y col., 2010; Rastogi y col., 2021).

En resumen, resultan múltiples las vías de dispersión de los CE en el ambiente, a partir de fuentes de contaminación que resultan ser prácticas cotidianas y fuertemente establecidas en el mundo actual. Si bien las regiones urbanas son las principales fuentes de contaminación debido a la presencia de los hospitales, las plantas industriales y las instalaciones de tratamiento de aguas residuales, debe considerarse la contribución de las regiones rurales en las que la agricultura, la ganadería y la acuicultura representan prácticas antrópicas fundamentales (Santos y col., 2010). En la figura 1 se resumen estas fuentes de contaminación.

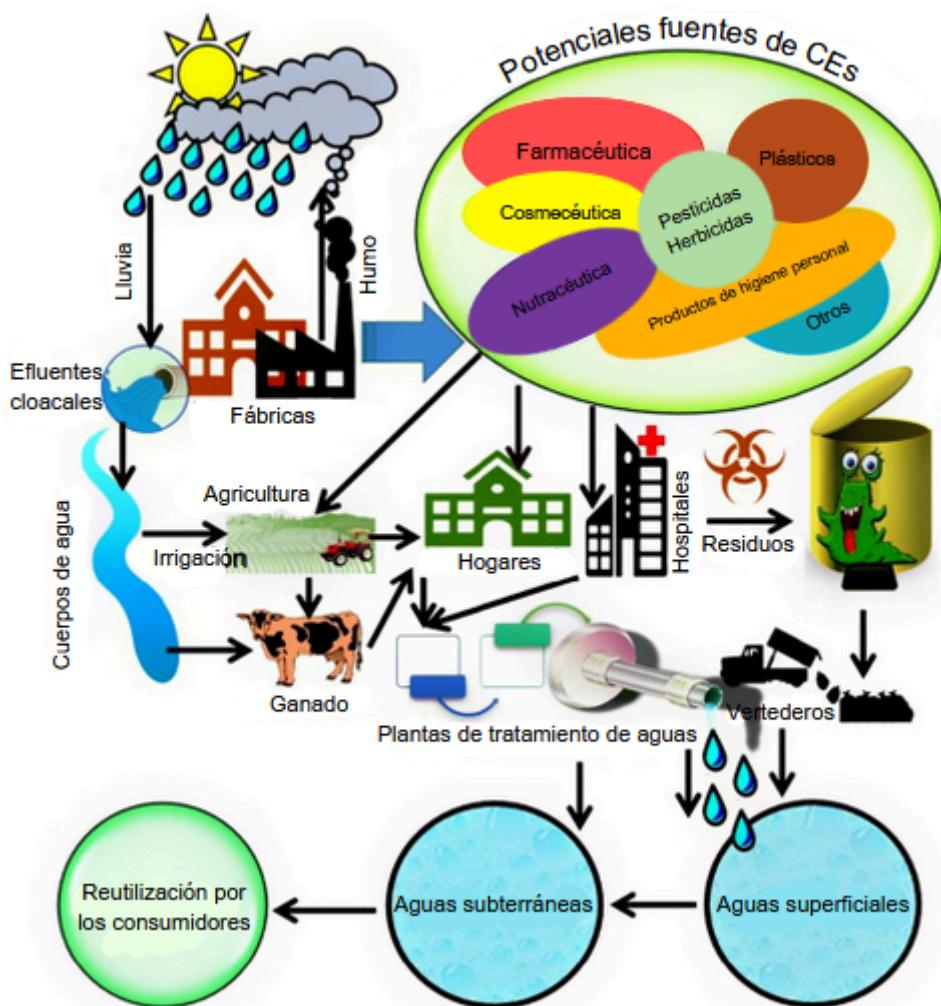


Figura 1. Ciclo de vida de los contaminantes de preocupación emergente (CE). Esquema mostrando la distribución del ciclo de vida de los contaminantes emergentes desde el punto de vista de las fuentes al de los receptores. Tomado y modificado de Rasheed y col., 2019.

c. Los antiinflamatorios no esteroideos

En la gama de los productos farmacéuticos, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE, NSAID en la literatura anglosajona) ocupan el primer lugar en términos de compuestos farmacéuticos detectados en el ambiente (Figura 2, Santos y col., 2010; Valdez-Carrillo y col., 2020). La prevalencia de los AINE en el ambiente está directamente relacionada con su uso cada vez mayor a nivel mundial, fenómeno que se ve reflejado en el crecimiento de este tipo de fármacos en el mercado. Tanto los analgésicos como los AINE tuvieron el mayor volumen de venta mundial en el año 2020, rondando los 48 mil millones de dólares, mientras que otros medicamentos como los antidepresivos (28 mil millones de dólares), los antihipertensivos (24 mil millones de dólares), los antifúngicos (13 mil millones de dólares) y los anestésicos (2 mil millones de dólares) tuvieron una comercialización significativamente menor (Rastogi y col., 2021). En consonancia, en el año 2020 el volumen

de compuestos farmacéuticos alcanzó 4,5 trillones de dosis a nivel mundial (Science Perspectives, 2022).

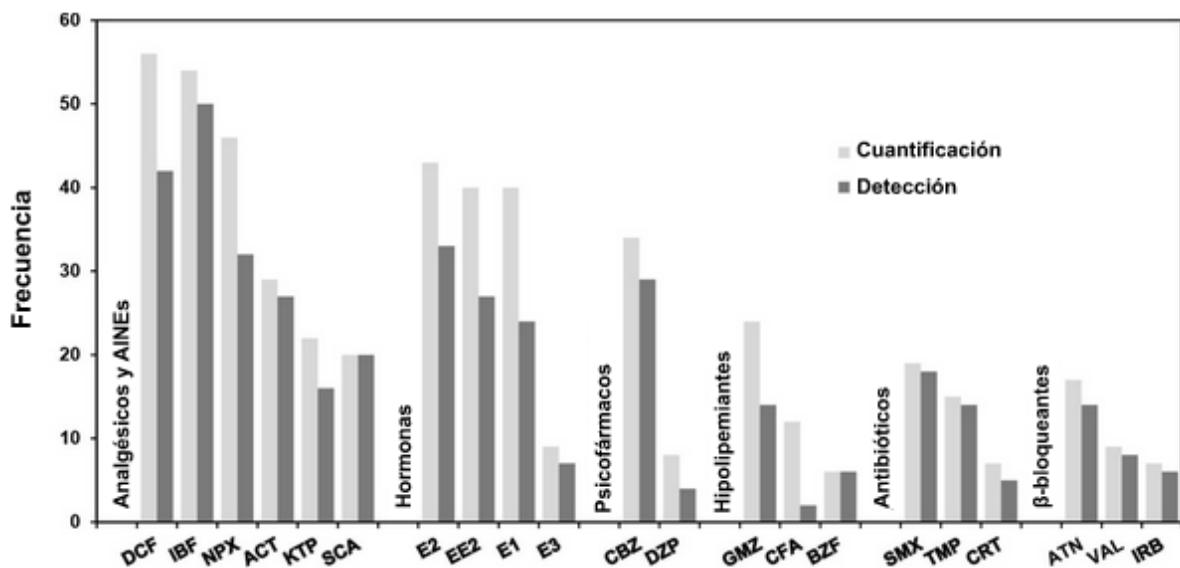


Figura 2. Compuestos farmacéuticos detectados en el ambiente. Gráfico de frecuencias que muestra la cuantificación y detección de los compuestos farmacéuticamente activos más comunes de cada clase terapéutica en Latinoamérica (desde 2007 al 2017). Tomado y modificado de Valdez-Carrillo y col., 2020. Abreviaturas: diclofenac (DCF), ibuprofeno (IBF), naproxeno (NPX), paracetamol (ACT), ketoprofeno (KTP), ácido salicílico (SCA), 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2), estrona (E1), estriol (E3), carbamazepina (CBZ), diazepam (DZP), gemfibrozil (GMZ), ácido clofibríco (CFA), bezafibrato (BZF), sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP), claritromicina (CRT), atenolol (ATN), valsartán (VAL), irbesartán (IRB).

Los AINE constituyen uno de los productos farmacéuticos más utilizados en medicina humana y veterinaria, dado que la mayoría de ellos pueden adquirirse sin prescripción médica al menos en varios países de Latinoamérica. Es por esto que resulta de vital importancia investigar estos compuestos desde una perspectiva ambiental, ya sea en relación a su modo de acción, su dispersión y persistencia en el ambiente y sus potenciales efectos ecotoxicológicos, evaluando además las regulaciones existentes. Como menciona Valdez-Carrillo y col. (2020), en Latinoamérica la principal fuente de compuestos farmacéuticamente activos en el ambiente acuático son las aguas residuales y por lo tanto estos países deben redirigir esfuerzos para desarrollar tecnologías de tratamiento eficientes y rentables, además de planificar y aplicar estrategias de gestión y regulaciones de aguas residuales.

Los AINE son una familia de ácidos débiles con propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas. Su modo de acción consiste en la inhibición de la producción endógena de prostaglandinas. Estas sustancias se encuentran dentro del grupo de los lípidos eicosanoides (20 carbonos) y derivan principalmente del ácido araquidónico (AA), un ácido graso que forma parte de las membranas celulares y se sintetiza a partir de uno de los ácidos grasos esenciales, el ácido linoleico.

En mamíferos, se sabe que la síntesis de prostaglandinas comienza con la liberación del AA de la membrana celular mediante la enzima fosfolipasa A2 (PLA2). Una vez liberado al citosol, el AA puede seguir varias rutas metabólicas derivando en diversos eicosanoides. Una de esas rutas involucra la acción de las enzimas ciclooxygenasas (COX) dando origen a los prostanoïdes que median de forma autocrina y paracrina en la respuesta inflamatoria, e incluyen tanto a las prostaglandinas (PG) como a los tromboxanos (TX) (Figura 3; Cantú y col., 2017).

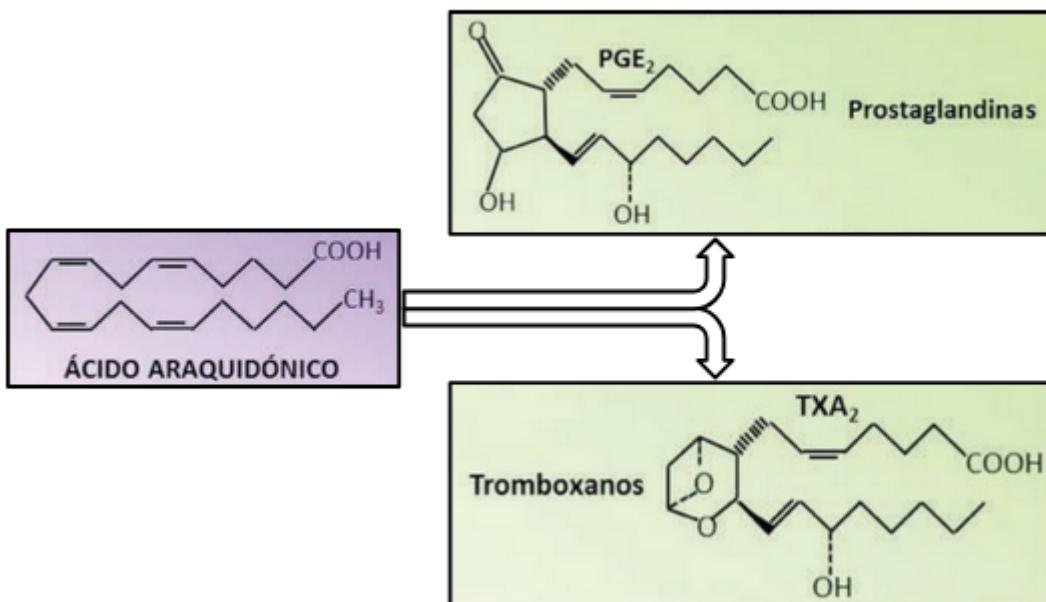


Figura 3. Estructura molecular del ácido araquidónico y de algunos de los prostanoïdes derivados.
Abreviaturas: prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2). Tomado y modificado de Cantú y col., 2017.

Las COX son el blanco molecular de los AINE cuyo mecanismo de acción implica la inhibición reversible o irreversible de estas enzimas. Con el objetivo de inhibir la producción de las PG que se desencadena durante un proceso inflamatorio, la industria farmacéutica ha desarrollado diversos AINE (además del DCF): meloxicam, celecoxib, piroxicam, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, ácido acetilsalicílico, indometacina, flurbiprofeno, entre otros. Estos compuestos tienen diferentes niveles de selectividad de las isoformas de COX debido a las diferencias en el tamaño del sitio de unión (Fent y col., 2006; Gan, 2010).

Asimismo, se han planteado otros mecanismos de acción del diclofenac que son independientes de las COX: inhibición de la síntesis de leucotrienos, inhibición de PLA2, modulación de los niveles de ácidos grasos libres, estimulación de los canales de potasio sensibles a ATP, e incremento de los niveles de β -endorfinas, entre otros (Gan, 2010).

Teniendo en cuenta todos los posibles modos de acción de estas drogas, resulta razonable preguntarse qué efectos podrían producir sobre especies no blanco en concentraciones ambientales. Actualmente existen diversos estudios acerca de los posibles efectos de los AINE sobre ecosistemas y organismos acuáticos, que se refieren más adelante.

d. Diclofenac

Estructura química

El DCF es un derivado del ácido fenilacético (ácido 2-[2,6-dicloranilino]fenilacético). Su fórmula y estructura química, así como la formulación sódica, se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del DCF (izquierda) y su formulación sódica (derecha).

Nombre del compuesto	ácido 2-[2,6-dicloranilino]fenilacético	[2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acetato de sodio
Estructura química		
Fórmula química	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂
Peso molecular	296,1 g/mol	318,13 g/mol
Núm. CAS	15307-86-5	15307-79-6
Acción terapéutica	-	Antiinflamatorio. Analgésico. Antipirético.
Solubilidad en agua (25°C)	2,37·10 ⁻³ mg/mL	21,3 mg/mL
pK _a	4,15	
LogK _{ow}	4,51	-

La estructura polar del DCF lo convierte en una sustancia lipofílica y bioacumulable (Mirzaee y col., 2021). Se han reportado casos de bioacumulación de DCF en peces y en invertebrados expuestos a concentraciones ambientales (Acuña y col., 2015). Sin embargo,

no se conoce con exactitud su modo de acción en todo el espectro de fauna silvestre (Gan y col., 2010; Shah y Sorathia, 2020).

Debido a su estructura y su distribución en el ambiente, la vía de transformación física más relevante del DCF en aguas superficiales es por fotólisis, degradándose hasta un 90% de la sustancia en pocas horas (Schulze y col., 2010). Esto conlleva a la liberación rápida de otros derivados de la droga, que también son potencialmente tóxicos.

Concentraciones ambientales

Las concentraciones de DCF reportadas en agua, sedimento y biota son altamente variables, oscilando desde ng/L hasta $\mu\text{g}/\text{L}$ (Acuña y col., 2015; Bonnefille y col., 2018; Sathishkumar y col. 2020). En la figura 4 se muestra la gama de concentraciones detectadas en cuerpos de agua de distintas regiones del mundo, en relación con el nivel de consumo de DCF en cada país.

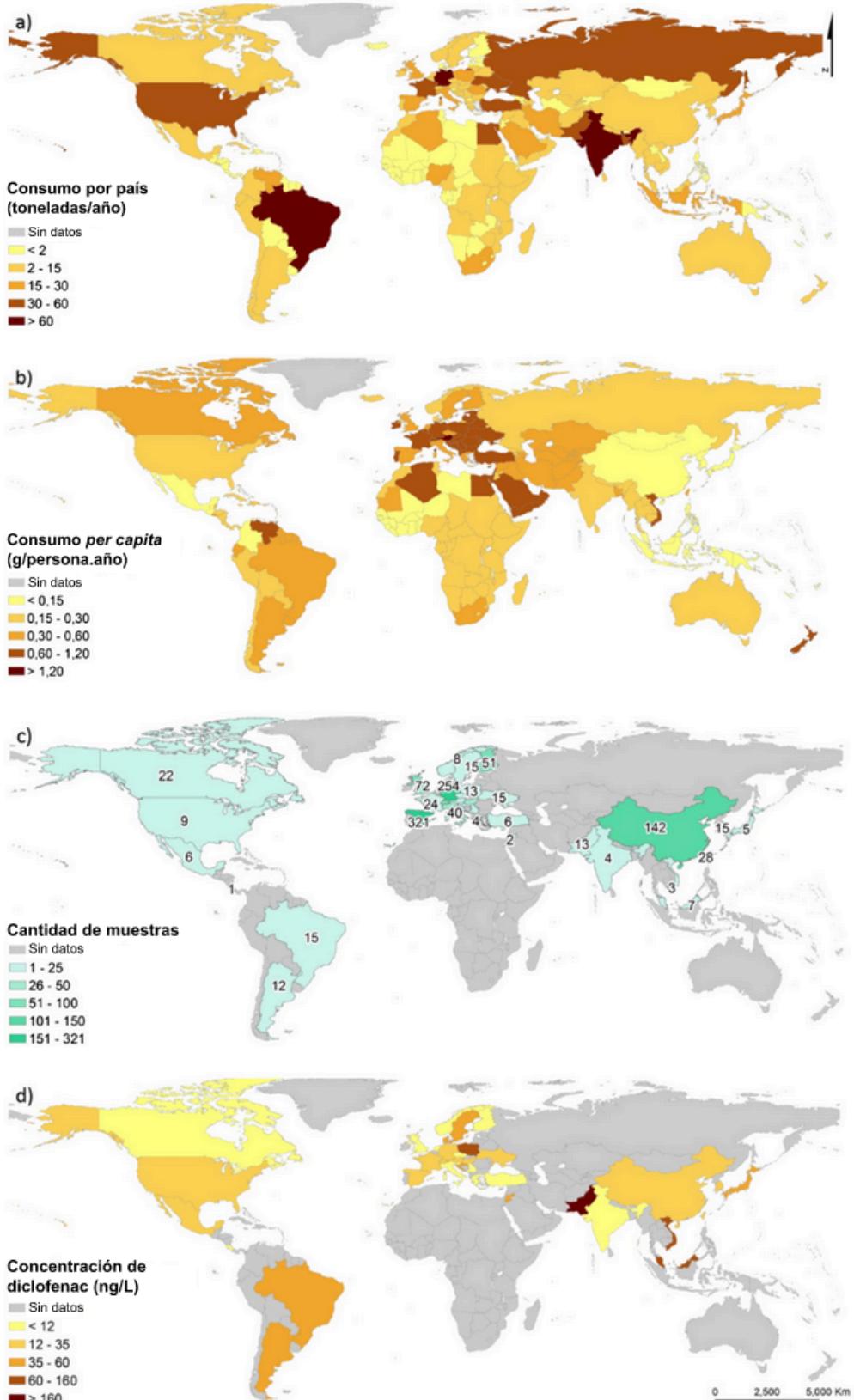


Figura 4. Mapa global de consumo y presencia de DCF. Mapa del consumo de diclofenac por país (a) y *per capita* (b), el número de muestras analizadas en ecosistemas de agua dulce (c) y la concentración media de diclofenac (d) por país. Tomado y modificado de Acuña y col., 2015.

La variabilidad en los niveles reportados de este fármaco se debe a distintos factores. Por un lado, la degradación natural de este compuesto está sujeta a condiciones ambientales que no son constantes, tales como el pH, la temperatura, la luz solar, la humedad y los microorganismos presentes en el ecosistema. No obstante, los AINE han sido clasificados como compuestos persistentes. En particular, la vida media del DCF en el ambiente se ha estimado entre 7 a 30 días (Rastogi y col., 2021). La reducida degradabilidad de los AINE y la falta de tecnología apropiada, son la causa de que no puedan ser adecuadamente depurados en las plantas de tratamiento de efluentes urbanos (Bonnefille y col., 2018). Miège y col. (2009) reunieron datos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales de distintos países y estimaron que la eficiencia de remoción del DCF usando barros activados promedia el 40%. Sumado a esto, debemos tener en cuenta factores socio-geográficos como la densidad demográfica, el consumo *per capita* del fármaco en un área determinada, el descarte ilegal de las industrias farmacéuticas, la eficiencia del saneamiento de las aguas residuales en cada localidad, entre otros aspectos. La Unión Europea considera que los AINE tales como el DCF, el ibuprofeno y el naproxeno se encuentran entre las sustancias farmacéuticas de alta prioridad para su estudio y monitoreo, en base a factores como la presencia, la toxicidad, y la persistencia (Rastogi y col., 2021).

En Argentina, esta droga se obtiene sin receta en las farmacias como un comprimido de uso oral en su formulación sódica o potásica, o bien como gel de aplicación dérmica local. Su presencia ya ha sido reportada en aguas del Río Suquía (Pcia. de Córdoba) a concentraciones de hasta 145 ng/L, en zonas donde las descargas de efluentes tratados constituyen una parte significativa del caudal del río cuya agua, además, se utiliza para potabilización y consumo humano (Valdés y col., 2014). En la región pampeana, se ha reportado un valor promedio de 340 ng/L en aguas superficiales, a menos de 1 km de plantas de tratamiento, con un pico máximo de 500 ng/L (Elorriaga y col., 2013). Otro estudio hecho en cinco localidades de la región pampeana arrojó valores de DCF de entre 30 y 1200 ng/L en efluentes de aguas residuales (Elorriaga y col., 2013). Estudios más recientes realizados en ríos urbanos (Luján y Reconquista) reportan niveles de DCF mayores a 5000 ng/L (Mastrángelo y col., 2022), evidenciando una marcada tendencia hacia una mayor presencia de este fármaco en el ambiente acuático.

Rojo y col. (2019) y Griboff y col., (2020) reportaron la presencia de DCF y de otros fármacos como β-bloqueantes, psicofármacos, anticoagulantes, antibióticos y diuréticos en el músculo de peces de la Cuenca del Río de la Plata con diferentes hábitos alimentarios y de relevancia para consumo humano. Si bien los niveles de DCF encontrados por Rojo y col.

(2019) son considerados aptos para una ingesta diaria, se mantiene una alerta sobre los posibles efectos en la salud humana y animal.

Además de las concentraciones ambientales, es crucial tener en cuenta el fenómeno de bioacumulación a la hora de evaluar los niveles de contaminantes en un ecosistema. El hecho de ser lipofílico convierte al DCF en potencialmente bioacumulable, registrándose en la biota silvestre valores que pueden superar los 100 ng/g (Huerta y col., 2014; Miller y col., 2018). Algunos experimentos realizados en peces indican que el DCF posee un factor de bioconcentración (concentración en tejidos/concentración en agua) que se ubica entre los valores más elevados reportados para fármacos ambientalmente relevantes, pudiendo alcanzar valores mayores a 1000 (Zenker y col., 2014). Más aún, el índice de riesgo ambiental (RQ) estimado para este fármaco (definido como la concentración ambiental/la concentración máxima sin efecto tóxico), ha sido reportado como mucho mayor a 1, lo cual indica con claridad su peligrosidad como contaminante ambiental (Bouissou-Schurtz y col., 2014; Gamarra y col., 2015).

Efectos tóxicos en especies no-blanco

El consumo continuo de fármacos, incluso a concentraciones subterapéuticas, conduce potencialmente al desarrollo de efectos adversos en la salud humana. A su vez, muchos organismos no blanco poseen vías metabólicas, receptores o biomoléculas similares a las de los seres humanos y son por lo tanto susceptibles a las sustancias activas que se liberan al ambiente. Por este motivo, resulta importante desarrollar e implementar ensayos para determinar si la exposición a estos contaminantes conduce a efectos adversos en las especies silvestres acuáticas y terrestres. Estas pruebas deben contemplar tanto los efectos agudos como los efectos crónicos, siendo estos últimos particularmente relevantes en lo que respecta a los CE que suelen encontrarse en concentraciones muy bajas, pero constantes. Los *endpoints* o puntos finales que suelen determinarse en estos ensayos abarcan desde cito- e histotoxicidad y neurotoxicidad hasta efectos macroscópicos tales como mortalidad, comportamiento, tasa de crecimiento y potencial reproductivo (Santos y col., 2010).

Entre los efectos de toxicidad reportados en especies no blanco, uno de los casos más emblemáticos es el de los buitres de India. Varias especies del género *Gyps* (*Gyps bengalensis*, *Gyps indicus* y *Gyps tenuirostris*) sufrieron graves disminuciones poblacionales (hasta 95%) a causa de la exposición a DCF. En estas aves se encontró la enfermedad conocida como gota visceral, generalmente originada a partir de daño renal ocasionado, en este caso, por la exposición aguda a DCF. La fuente de exposición más relevante resultó ser

el ganado que es típicamente tratado con DCF en Pakistán y que, una vez muerto por enfermedades o lesiones, se lo deja a la intemperie para que sea devorado por animales carroñeros. Este evento resulta clave como evidencia de bioacumulación de DCF en la cadena trófica (Oaks y col., 2004).

Sin embargo, entre todos los animales del mundo, los más damnificados resultan ser aquellos que habitan ambientes acuáticos dado que están constante y directamente expuestos a las sustancias tóxicas que ingresan a los cuerpos de agua. En un estudio realizado con el crustáceo cladócero *Daphnia magna*, el alga clorofita *Desmodesmus subspicatus* y la macrofita *Lemna minor*, el DCF demostró ser el de mayor toxicidad aguda, comparado con una serie de otros AINES, en cada una de esas especies (Cleuvers, 2003; Santos y col., 2010). Más aún, Fent y col. (2006) reafirman que el DCF resulta ser el AINE de mayor toxicidad aguda en muchas otras especies, luego de recopilar valores de CE_{50} y CL_{50} de una gran cantidad de trabajos.

Si bien los estudios de toxicidad aguda resultan importantes para caracterizar la peligrosidad de un compuesto, los estudios de toxicidad subcrónica se asemejan más al tipo real de exposición: concentraciones relativamente bajas durante prolongados períodos de tiempo. En este campo, se han realizado estudios en varias especies de peces, entre ellas la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*. Un bioensayo de 28 días de exposición a 1 $\mu\text{g/L}$ de DCF ocasionó daños en ejemplares de esta especie a nivel citológico en hígado, riñones y branquias (Triebeskorn y col., 2004). Es esperable que estos tres órganos sean los más afectados frente a la exposición a sustancias tóxicas, dado que están fuertemente involucrados en el metabolismo, la excreción y la absorción respectivamente, de la sustancia activa o sus metabolitos. En concordancia, en la misma especie expuesta durante 28 días a 5 $\mu\text{g/L}$ de DCF, se encontró bioacumulación de esta droga en los tres órganos mencionados y además en músculo (Triebeskorn y col., 2004). Otro estudio realizado en trucha marrón (*Salmo trutta*) también mostró daño citológico en hígado, riñones y branquias, además de alteraciones en los niveles de eritrocitos, luego de una exposición de 21 días a 0,5 $\mu\text{g/L}$ de DCF (Hoeger y col., 2005).

Los resultados obtenidos en los diferentes bioensayos llevan a preguntarse cuáles son los blancos moleculares o sitios de acción que al interactuar con los AINES generan efectos tóxicos en las especies silvestres. Se sabe, por ejemplo, que en las aves las prostaglandinas están involucradas en la biosíntesis de las cáscaras de huevo y se ha visto que el tratamiento con un AINE lleva al adelgazamiento de estas cáscaras. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de las posibles contrapartes de los blancos moleculares en invertebrados y se sabe

apenas un poco más respecto de los peces. En estos últimos, por ejemplo, se encontraron homólogos de COX en diversas especies (la trucha arcoiris, *O. mykiss*; el pez dorado, *Carassius auratus*; la trucha de arroyo, *Salvelinus fontinalis*; y el tiburón *Squalus acanthias*). Por su parte, en artrópodos y moluscos, la formación de prostaglandinas estaría mediada por una enzima tipo COX que aún no ha sido caracterizada (Fent y col., 2006).

Un parámetro que resulta importante en toxicología es la concentración más baja a la cual la sustancia a evaluar produce un efecto nocivo (LOEC, por sus siglas en inglés). Acuña y col. (2015) revisaron un gran número de publicaciones con el fin de compilar los valores de LOEC para DCF y encontraron un intervalo enormemente amplio: entre 0,01 y 40.000 µg/L de DCF (sin distinguir entre especies ni entre efectos). Estos valores se pueden observar en la tabla 3, donde se indica la especie, el tiempo de exposición, el punto final y la LOEC correspondiente. Ahora bien, en la rama de la ecotoxicología resulta importante comparar los valores de LOEC con las concentraciones ambientales. En este sentido, Acuña y col. afirman que si bien la mediana de LOEC reportado en la literatura (3000 ng/L) es mucho más alta que la mediana ambiental informada (21 ng/L), existe un intervalo no despreciable de solapamiento de los valores de LOEC más pequeños (hasta 30 ng/L) con un amplio número de reportes de concentraciones ambientales (42% de las muestras analizadas; figura 5). Por este motivo, el DCF resulta una droga que podría generar efectos dañinos en los ecosistemas. Además, los investigadores mencionan la importancia de tener en cuenta los productos de fototransformación del DCF, dado que se han encontrado derivados aún más tóxicos como el CPAB (2-[2-(chlorophenyl)amino]benzaldehyde) en algas, como en el caso de *Scenedesmus vacuolatus* (Schulze y col., 2010).

Tabla 3. Efectos en especies no-blanco. Valores de LOEC reportados para diferentes especies y bioensayos con DCF. Tomado y modificado de Acuña y col., 2015.

Especie		Tiempo de exposición	Punto final	LOEC (µg/L)
Biofilm de río	Bacterias, protozoos, micrometazoos	8 semanas	Biomasa, grosor, estructura de la comunidad	10
Clorofita	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	96 h	Crecimiento	20.000
Crustacea	<i>Carcinus maenas</i>	No reportado	Capacidad de osmorregulación	0,01
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 días	Reproducción	2.000
	<i>Daphnia magna</i>	96 h	Reproducción	0,36
		48 h	Inmovilización e inducción de Hsp70	40.000
		21 días	Estrés oxidativo	32.000

Mollusca	<i>Dreissena polymorpha</i>	96 h	Reducción de la viabilidad de hemocitos	1
		96 h	Estrés oxidativo con altos niveles de peroxidación lipídica	1
Peces	<i>Cirrhinus mrigala</i>	96 h	Cambios en la actividad enzimática	1
		35 días	Cambios en la actividad enzimática	1
	<i>Cyprinus carpio</i>	96 h	Alteraciones en la actividad hematológica y bioquímica	1
		30 días	Disminución de la cantidad de TBARS	0,03
		28 días	Cambios en la ultraestructura del hígado, en el glucógeno del hígado y en las proteínas de riñones	1
	<i>Danio rerio</i>	28 días	Crecimiento	15.000
	Embriones de <i>Danio rerio</i>	48 h	Estrés oxidativo, vía apoptótica intrínseca, desregulación de la actividad de kinasas, gluconeogénesis, metabolismo lipídico	1.250
		90 min	Reducción de peroxidación lipídica	0,03
		10 días	Supervivencia	8.000
		96 h	Tiempo hasta la eclosión	1.000
		96 h	Hsp 70	2.000
	<i>Oryzias latipes</i>	4 días	Toxicidad celular, genotoxicidad relacionada con p-53, efectos estrogénicos	1
		9 días	Comportamiento	1.000
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	28 días	Lesiones renales y alteraciones en branquias	5
		28 días	Alteraciones en hígado, riñones y branquias	1
		21 días	Funciones bioquímicas y daño tisular	1
	Embriones de <i>Salmo trutta</i>	90 días	Tiempo hasta la eclosión	2.000
Plantas	<i>Polystichum setiferum</i>	48 h	Actividad mitocondrial	0,3
		7 días	Crecimiento	0,03
Rotatoria	<i>Brachionus calyciflorus</i>	48 h	Reproducción	25.000

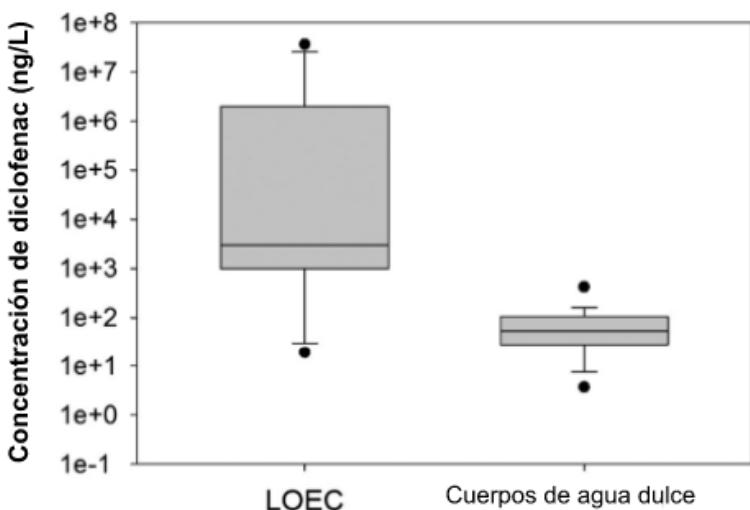


Figura 5. Relación entre la concentración ambiental y LOEC. Gráfico de cajas con las concentraciones LOEC y las detectadas en el ambiente. Las barras horizontales internas corresponden a la mediana. Las barras de error delimitan el percentil 5 y 95. Tomado y modificado de Acuña y col., 2015

II) Marco del plan de trabajo

El presente trabajo de tesis de licenciatura se enmarca dentro del Proyecto de Unidades Ejecutoras PUE (IBBEA, UBA-CONICET) titulado: “Desarrollo experimental de una cadena trófica modelo para evaluar los efectos de la biomagnificación de contaminantes ambientales”. El proyecto, cuyo responsable técnico es el Dr. Enrique M. Rodríguez, contempla el desarrollo en laboratorio de una cadena trófica modelo para evaluar la biomagnificación y los efectos subletales de algunos fármacos de uso humano y veterinario más utilizados actualmente en Argentina, que han sido catalogados como contaminantes ambientales de preocupación emergente; tal es el caso del DCF. El proyecto propone evaluar los efectos crónicos y acumulativos en el ambiente sobre un conjunto de biomarcadores, a medir en los distintos niveles tróficos, a fin de poner a prueba la hipótesis de la magnificación del efecto tóxico a lo largo de la cadena trófica. Entre estos biomarcadores, se incluyen indicadores de estrés oxidativo, expresión génica de enzimas y otras proteínas, hematológicos, histopatológicos y fisiológicos. Los resultados que se obtengan serán transferidos a las autoridades de regulación pertinentes, sirviendo además la cadena trófica desarrollada como herramienta a futuro para la evaluación del grado de biomagnificación de otros contaminantes ambientales.

En este contexto, se han seleccionado dos especies tróficamente relacionadas: el crustáceo cladócero *Daphnia magna*, perteneciente al zooplancton, y el pez nectónico *Poecilia reticulata*.

III) *Daphnia magna*

a. Descripción general

Posición taxonómica (ITIS, *Integrated Taxonomic Information System - Report*):

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Crustacea

Clase: Branchiopoda

Superorden: Anomopoda

Orden: Diplostraca

Suborden: Cladocera

Familia: Daphniidae

Género: *Daphnia*

Especie: *Daphnia magna* Straus, 1820

D. magna es una especie de crustáceo cladócero conocida vulgarmente como pulga de agua. Se encuentra ampliamente distribuida en el hemisferio norte, en cuerpos de agua dulce presentes en Europa, Asia y América del Norte (Weber, 1993). Es el cladócero herbívoro más grande del hemisferio norte, con un tamaño adulto de 5 a 6 mm (Koivisto, 1995). Las *Daphnia* son crustáceos planctónicos que pertenecen a la clase Branchiopoda, caracterizada por poseer apéndices aplanados utilizados para producir una corriente de agua dirigida al aparato filtrante. Dentro de los branquiópodos, *Daphnia* pertenece al grupo Cladocera, cuyos cuerpos están delimitados por un caparazón no calcificado, compuesto en gran parte por quitina. Los cladóceros tienen hasta 10 pares de apéndices, que son (de anterior a posterior): antenas primarias unirrámicas, antenas secundarias birrámicas (utilizadas para nadar), maxilares y mandíbulas en la cabeza, seguido de un abdomen con 5 (en el género *Daphnia*) o 6 pares de extremidades. Estos últimos apéndices son utilizados para alimentarse y respirar, formando la corriente de agua mencionada más arriba. En el extremo caudal del abdomen se observa un telson con un par de procesos en forma de garra. El caparazón, que recubre externamente todo el abdomen, finaliza posteriormente en una espina caudal. Los machos se distinguen de las hembras por su tamaño más pequeño, antenas primarias más grandes, abdomen modificado con setas y un par de apéndices abdominales modificados en ganchos (Figura 6; Ebert, 2005; Mittman y col., 2014; Olmstead y LeBlanc, 2000). Los organismos del género *Daphnia* poseen un único ojo compuesto de color oscuro localizado en la región

antero-medial delcefalotórax, como resultado de la fusión de dos ojos de color rosado durante el desarrollo embrionario (Huamán, 2017).

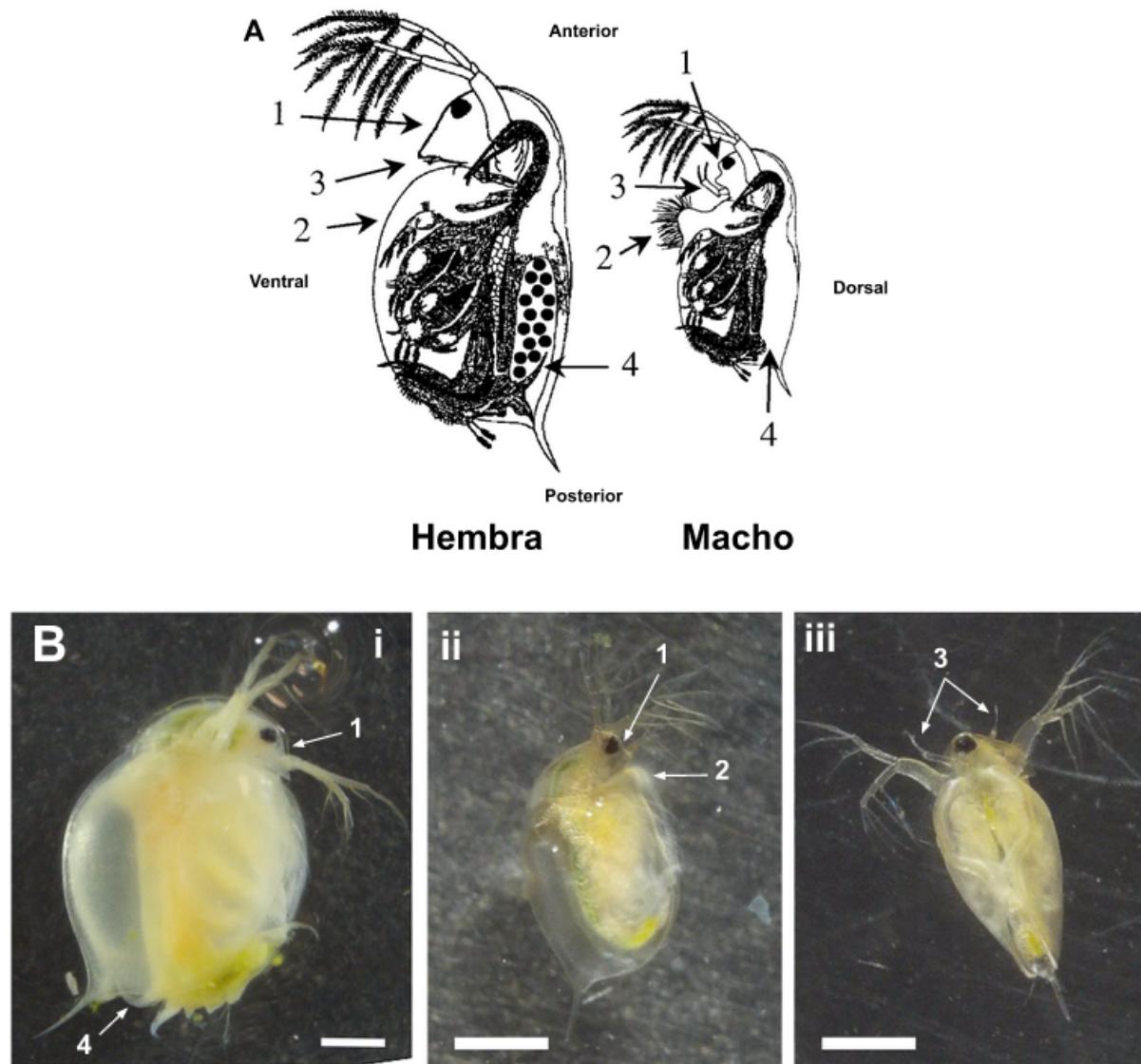


Figura 6. Morfología externa de *D. magna*. A: esquema representando las características sexuales secundarias de los adultos. En la hembra, la cabeza presenta un rostro alargado (1); el borde ventral del caparazón debajo de la cabeza es liso sin setas presentes (2); las primeras antenas son diminutas (3); y un largo proceso abdominal forma el límite posterior de la cámara de cría (4). En el macho, la parte frontal de la cápsula de la cabeza está aplanada (1); el borde ventral del caparazón debajo de la cabeza está modificado y recubierto con setas (2); las primeras antenas son alargadas (3); y el proceso abdominal está ausente (4). Tomado y modificado de Olmstead y LeBlanc, 2000. B: fotografías de ejemplares. Vista lateral de una hembra (i). Vista lateral (ii) y ventral (iii) de un macho. Barras: 1 mm.

b. Reproducción y desarrollo

D. magna pertenece al superorden Anomopoda, cuyos embriones suelen presentar desarrollo directo. En condiciones ambientales favorables, se reproduce asexualmente por partenogénesis; la hembra produce huevos (que también serán hembras) y los mantiene en

una cámara de incubación ubicada dorsalmente debajo del caparazón (Figuras 7 A y B). Aproximadamente a los 7 días de vida, las crías eclosionadas tienen su primera camada y en un ambiente favorable siguen reproduciéndose asexualmente toda su vida cada 3 días (Mu y LeBlanc, 2002; Wang y col., 2005). Los embriones se desarrollan directamente y eclosionan como organismos de alimentación libre (denominados neonatos, Figura 7B). Durante la eclosión, la hembra flexiona el abdomen hacia delante, desplazando el proceso abdominal que retenía los huevos dentro de la cámara de incubación, para permitir la salida de los neonatos. Despues de ser liberados, los neonatos se observan como juveniles muy parecidos a los adultos, pero sin los caracteres sexuales secundarios (Figura 7B; Mittman y col., 2014; Olmstead y LeBlanc, 2000).

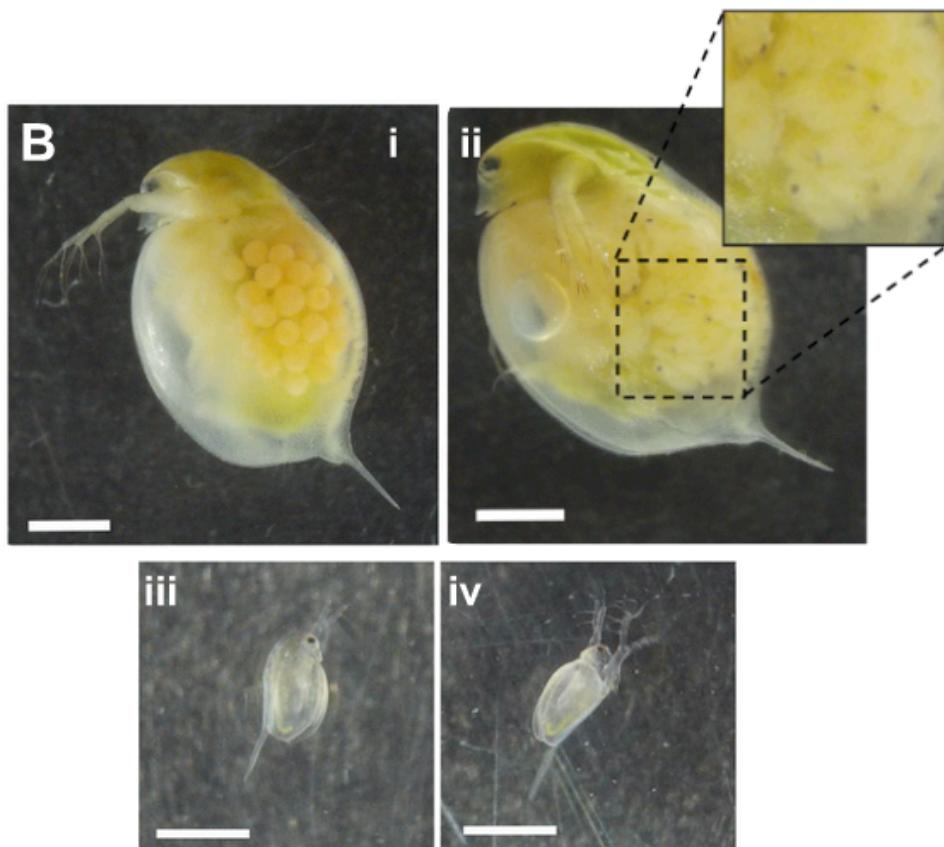
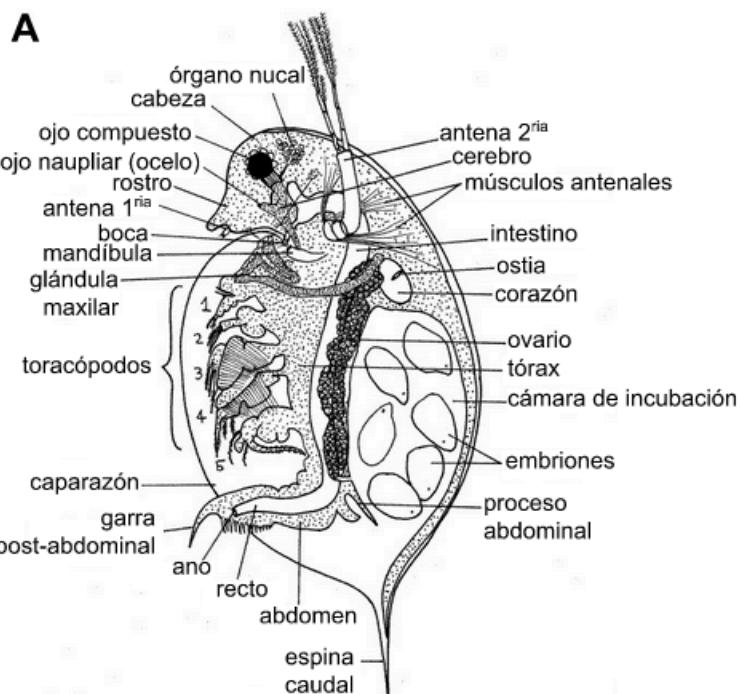


Figura 7. Reproducción y desarrollo de *D. magna*. A: anatomía interna. Esquema de una hembra adulta señalando las diferentes estructuras del organismo, entre las que se encuentran el ovario, la cámara de incubación contenido embriones y el proceso abdominal. Tomado y modificado de Freeman y Bracegirdle (1971). B: fotografías de los ejemplares adultos. Vista lateral de una hembra con embriones en un estadio de desarrollo temprano (i) y tardío (ii, se identifican los neonatos con el ojo en desarrollo). Vista lateral (iii) y ventro-lateral (iv) de un neonato. Barras: 1 mm.

En lo que respecta a su ecología, esta especie habita en pequeños estanques eutróficos que pueden ser permanentes o temporales (con temporada de sequía). Pueden habitar también en estanques que se congelan en invierno. Tales ambientes presentan fuertes fluctuaciones en el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno, la salinidad y otros factores abióticos. Sin embargo, *D. magna* está adaptada a tales fluctuaciones: tolera condiciones de bajo oxígeno y amplias variaciones de pH, salinidad y temperatura. Cuando las condiciones se tornan demasiado desfavorables, las hembras comienzan a procrear machos y la relación de sexos adquiere una proporción adecuada para la reproducción sexual (Kleiven y col., 1992). En este caso, las hembras producen huevos en diapausa, denominados epifias, que son fecundados por los nuevos machos. Estos huevos constituyen una estructura de resistencia al congelamiento y a la sequía. Así, este tipo de reproducción sexual posibilita la continuidad de la población hasta que las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables. Además, es una estrategia para aumentar la diversidad genética de la población (Olmstead y LeBlanc, 2000; Koivisto, 1995).

c. Estudios toxicológicos

D. magna ha sido ampliamente utilizada como organismo modelo en estudios de toxicología acuática, hidrobiología y ecología acuática debido a su pequeño tamaño, su alta fecundidad, su ciclo de vida corto, su reproducción partenogénica y su fácil mantenimiento en laboratorio (Koivisto, 1995; Martínez-Jerónimo, 2012; OECD, 2012). La condición partenogénica se puede lograr en el laboratorio generando las condiciones óptimas para la supervivencia del cultivo. Esto permite evaluar los efectos de compuestos presuntamente tóxicos sobre el ciclo de vida asexual. Por otro lado, también se han realizado estudios sobre los efectos de diversos tóxicos en la proporción de sexos (Olmstead y LeBlanc, 2000; Hanazato, 2001).

En relación al DCF, se han descripto efectos adversos relacionados principalmente con el sistema endocrino de crustáceos. Como se mencionó anteriormente, el principal modo de acción del DCF está dado por la inhibición de la enzima COX, que cataliza la síntesis de prostaglandinas. Dado que en crustáceos la maduración final del ovario se encuentra bajo el control directo y local de las prostaglandinas (Tahara y Yano, 2004), es esperable que el DCF afecte este proceso. Otros reportes sugieren que el DCF podría actuar como xenoestrógeno, dado que produjo niveles aumentados de vitelogenina en *D. magna* en ensayos de toxicidad aguda (Liu y col., 2017). Se ha propuesto también que las prostaglandinas están involucradas en la síntesis de esteroides sexuales en crustáceos y, dada su naturaleza autocrina y/o

paracrina, podrían ser mediadores del efecto estimulante de progesterona y otros esteroides (Han et al., 2010).

En lo que respecta específicamente a *D. magna*, Liu y col. (2017), luego de recopilar diversos estudios ecotoxicológicos realizados en esta especie, llegaron a la conclusión de que la reproducción y el desarrollo son *endpoints* más sensibles que la supervivencia. Los parámetros a evaluar a nivel de la reproducción y el desarrollo de *D. magna* suelen ser la frecuencia de muda, el tamaño corporal, la tasa de crecimiento, el tiempo necesario para producir la primera camada de huevos, el tiempo hasta la primera eclosión, el número de neonatos por camada, el número total de neonatos por hembra, el número de camadas total por hembra y la tasa de mortalidad de la progenie.

Otro parámetro que se ha evaluado en *D. magna* es la incidencia de malformaciones en los neonatos, como por ejemplo el desarrollo incompleto de antenas, la espina caudal curvada o replegada, o el desarrollo arrestado (LeBlanc y col., 2000).

IV) *Poecilia reticulata*

a. Descripción general

Posición taxonómica (CABI Compendium 2023, *Digital Library*):

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Clase: Actinopterygii

Orden: Cyprinodontiformes

Familia: Poeciliidae

Género: *Poecilia*

Especie: *Poecilia reticulata* Peters, 1859

Poecilia reticulata es un pez del orden Cyprinodontiformes originario de la región septentrional de Sudamérica (Venezuela, Trinidad y Tobago, Guyana) que ha sido introducido en gran parte del planeta tanto para acuarismo como para control biológico de mosquitos. Esta especie recibió muchos nombres científicos a lo largo de la historia hasta que finalmente se oficializó el nombre actual, que es precisamente la primera denominación que recibió en 1859. Sin embargo, vulgarmente persisten algunas de las denominaciones pasadas, tales como *guppy* o *lebistes* (Deacon, 2023).

P. reticulata pertenece a la familia de los poecílidos, constituida por una gran diversidad de especies de agua dulce con fecundación interna y reproducción ovovivípara. Además, esta especie presenta dimorfismo sexual (Figura 8A). Las poblaciones salvajes presentan machos de entre 15-20 mm de largo estándar, con aletas caudales llamativas y muy desarrolladas, y aletas dorsales que exhiben patrones polimórficos con rayas y motas de diversos colores, además de una aleta anal modificada denominada gonopodio, que funciona como órgano sexual intromitente. Por otro lado, las hembras poseen mayores tallas (20-25 mm de largo estándar), de color plateado y con la aleta anal redondeada. Cuando las hembras están grávidas, es decir, cuando se encuentran gestando embriones, se hace visible una mancha oscura lateral a la altura de la aleta anal denominada punto grávido. Además, se evidencia un crecimiento de la región ventral del abdomen. Al momento del nacimiento (también denominada puesta), del orificio urogenital de la hembra grávida se liberan juveniles, ya sin saco vitelino y eclosionados de su envoltura vitelina; estos juveniles se parecen externamente a los adultos, pero son mucho más pequeños y carecen de madurez sexual (Deacon, 2023).

Resulta importante mencionar que las variedades ornamentales suelen ser más grandes (machos: 25-35 mm, hembras: 40-60 mm, largo estándar) y coloridas que las salvajes. Para los bioensayos de esta tesis, se utilizaron variedades ornamentales (Figura 8B).

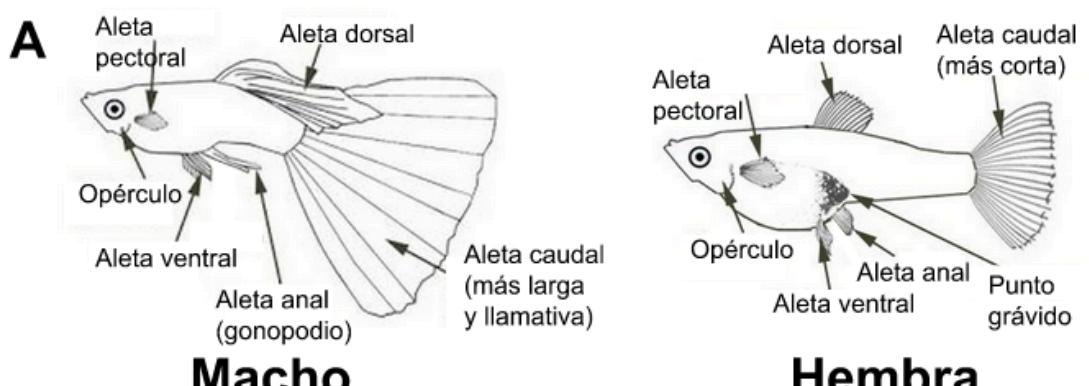


Figura 8. Morfología externa de *P. reticulata*. A. Esquema de machos y hembras adultos. Se señalan las principales diferencias debidas al dimorfismo sexual, tales como la morfología de las aletas y el punto grávido. Tomado y modificado de <https://www.renafishstore.ca/guppy1.html#/> B. Fotografías de ejemplares del cultivo utilizados en el presente trabajo de tesis. Hembra grávida con abdomen prominente (i), hembra no grávida con abdomen aplanado (ii), macho con colores y patrones llamativos (iii). Barras: i-iii: 1cm.

b. Reproducción y desarrollo

Como se mencionó anteriormente, los poecilidos se caracterizan por tener fecundación interna y desarrollo ovovivíparo. Básicamente, durante el apareamiento, los machos introducen su gonopodio en el orificio urogenital de la hembra (conectado al oviducto y al ovario) y liberan espermatozeugmata -estructuras gelatinosas en donde se embeben cientos de espermatozoides- (Campuzano-Caballero y Uribe, 2014; Grier y col. 2016). El interior del ovario presenta una superficie replegada y una serie de microbolsillos que permiten almacenar el esperma de más de un macho hasta por 8 meses (Lambert 1970; Kobayashi y col., 2002; Deacon, 2023). La fecundación de los oocitos al igual que la gestación se da lugar dentro del ovario. Allí, los embriones se desarrollan dentro de folículos ubicados en la pared ovárica (desarrollo/gestación intrafolicular) (Brown-Peterson y col., 2011; Uribe y col., 2019). Si bien el desarrollo es interno, la nutrición de los embriones depende de forma exclusiva del vitelo almacenado previamente en los oocitos, de allí que se los considera ovovivíparos o vivíparos lecitotróficos (la nutrición es por vitelo y no hay nutrición materna de los embriones).

Según Shahjahan y col. (2013), el período de gestación de una camada en condiciones de laboratorio es de aproximadamente 28 días. La cantidad de crías por camada está sujeta al tamaño de la hembra y a condiciones externas tales como el equilibrio nutricional y las condiciones del medio. En poblaciones salvajes, las camadas constan en general de menos de 10 juveniles, en tanto que las hembras ornamentales, de mayor tamaño que las salvajes, pueden tener docenas de crías. Como máximo, se han reportado casos de hasta 100 juveniles por camada. Una vez que nacen, los juveniles presentan alimentación libre y alcanzan la madurez sexual entre las 10 y las 20 semanas de vida; las hembras se reproducen casi hasta el fin de su vida (20 a 34 meses). La temporada reproductiva natural de esta especie es durante el verano. Por lo tanto, si en cautiverio se mantiene la temperatura y el fotoperíodo de verano (14:10 L:O y 24°C en promedio), la especie se reproduce continuamente, siendo un excelente modelo para ensayos de toxicidad para evaluar por ejemplo, la reproducción y el desarrollo (Shahjahan y col., 2013; Deacon, 2023).

c. Morfología interna

Las hembras poseen un único ovario alargado con una región germinal que se continúa en un oviducto sin células germinales, que se abre en un orificio urogenital por delante de la aleta anal (Campuzano-Caballero y Uribe, 2014; Deacon, 2023). La superficie

luminal de la túnica albugínea se encuentra replegado formando lamelas con epitelio folicular y germinal, sostenido por un estroma de tejido conectivo vascularizado. En los peces Cyprinodontiformes, se suelen observar simultáneamente oocitos en varios estadios de maduración (tipo de ovario asincrónico). Se reconocen hasta 6 o 7 estadios, entre los que se destacan la fase previtelogénica (o de crecimiento primario), la fase vitelogénica (o de crecimiento secundario) y la fase madura, con sus respectivas características histológicas (Figura 9; Lambert, 1970; Genten, 2009; Brown-Peterson y col., 2011). Además, el hecho que *P. reticulata* posea fecundación secuencial de los oocitos por almacenamiento de esperma hace que haya fecundación por tandas, llegando a coexistir dentro de una misma hembra un grupo de embriones en las primeras etapas del desarrollo con otro grupo que ya está culminando la organogénesis (Brown-Peterson y col., 2011; Shahjahan y col., 2013).

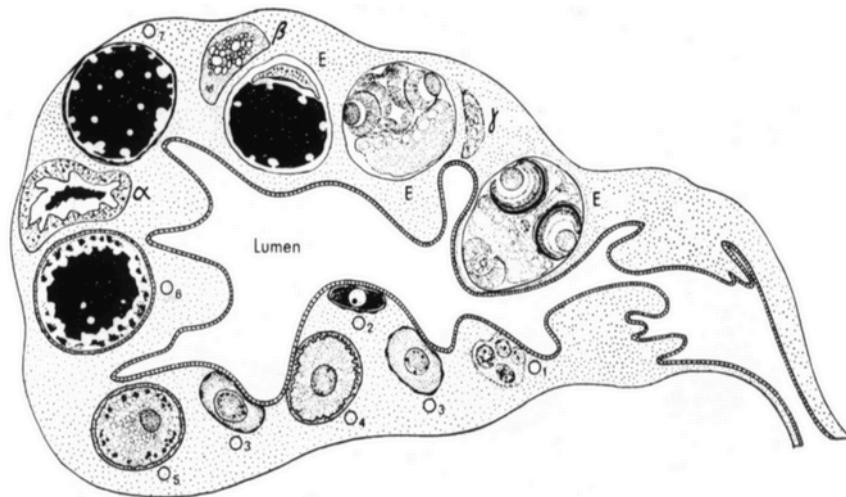


Figura 9. Representación esquemática de una sección transversal del ovario de *P. reticulata*. El desarrollo de los oocitos y embriones ocurre dentro de la pared ovárica (desarrollo y gestación intrafolícular). Las distintas etapas del crecimiento y de la atresia del folículo se han combinado en un solo esquema, aunque en realidad estas etapas no ocurren simultáneamente. Abreviaturas: embriones en desarrollo (E), etapas de atresia folicular (α , β , γ), oocitos en diversas etapas de desarrollo (O_1 - O_7), lumen: luz del ovario que se continúa con el oviducto y el orificio urogenital. Tomado de Lambert, 1970.

La mayoría de los peces teleósteos utilizan las branquias como la principal estructura respiratoria, aunque también cumplen un rol importante en la excreción. Esta estructura posee cuatro arcos branquiales de cada lado, que se extienden desde el piso hasta el techo de la cavidad bucal. Cada arco branquial soporta un determinado número de filamentos branquiales (o filamentos primarios), conteniendo un soporte cartilaginoso en el centro y vasos aferentes y eferentes. Además, están compuestos por dos hemibranchias simétricas. Cada hemibranchia contiene varias lamelas branquiales (o lamelas secundarias). Las lamelas

proveen una superficie extensa de intercambio de gases y sustancias, pero también este epitelio branquial resulta un blanco fácil para los contaminantes disueltos en el agua. Estas estructuras comprenden una envoltura de células epiteliales planas sujetas a una membrana basal, y una serie de células pilares que evitan que esa envoltura colapse. Las células pilares delimitan lagunas sanguíneas que comunican arteriolas aferentes con eferentes. Además, se reconocen dos tipos celulares especializados que se encuentran mayormente en la base de las lamelas: las células de cloro y las células mucosas. Las células de cloro cumplen una función en la regulación iónica, mientras que las células mucosas tienen un rol importante en la protección mecánica y en la respuesta inmune (Figura 10; Mallatt, 1985; Genten, 2009).

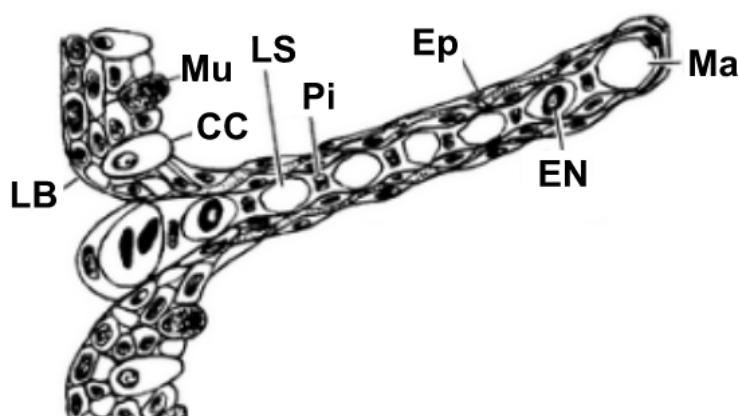


Figura 10. Esquema de una lamela branquial. Abreviaturas: célula de cloro (CC), célula epitelial (Ep), célula mucosa (Mu), célula pilar (Pi), eritrocito nucleado (EN), laguna sanguínea (LS), laguna sanguínea apical, también denominada canal marginal (Ma), lámina basal (LB). Tomado y modificado de Mallatt, 1985

Las funciones de excreción y osmorregulación en peces las realizan las branquias y los riñones. La mayoría de los desechos nitrogenados son eliminados por las branquias, mientras que los riñones juegan un rol muy importante en la regulación del balance osmótico (sales y agua). En los peces adultos, el riñón es enteramente mesonéfrico y se ubica en posición retroperitoneal, ventral a la columna vertebral, extendiéndose desde la cabeza hasta la región posterior de la cavidad abdominal. Por otro lado, además de la función osmorreguladora y excretora, el riñón de los peces contiene tejido hematopoyético, elementos fagocíticos y células endocrinas cromafínes y adrenocorticales (Genten, 2009).

El hígado de los peces tiene diversas funciones, entre las que se incluyen asimilación de nutrientes, procesamiento de biomoléculas, producción de bilis y detoxificación. Está compuesto por un parénquima de hepatocitos poliédricos que contienen depósitos de glucógeno. Este parénquima está atravesado por vasos sinusoides y ductos biliares. Además,

en algunas especies de peces (entre las que se encuentra *P. reticulata*) el hígado contiene tejido pancreático exocrino. Por este motivo, también se lo denomina “hepatopáncreas”. El páncreas exocrino consiste en cúmulos de células piramidales agrupadas en torno a vasos sanguíneos que atraviesan el hígado. Estas células tienen un citoplasma fuertemente basófilo, núcleo basal y muchos gránulos zimógenos acidófilos con función digestiva que son liberados en el intestino. Tanto en el hígado como en el páncreas exocrino es posible hallar centros melanomacrocíticos, un complejo de células fagocíticas y granulocitos del sistema inmune (Genten, 2009; Qualhato, 2018).

La porción de páncreas endocrino se encuentra disperso entre el tejido adiposo y los mesenterios, como cúmulos de células secretoras de hormonas rodeadas de capilares. La función principal del páncreas endocrino se relaciona con la regulación del metabolismo de la glucosa y las proteínas (Genten, 2009).

El intestino de los peces es muy variable en cuanto a longitud y morfología de la superficie luminal. En *P. reticulata* se diferencian estructuras denominadas *villi* o vellosidades, que consisten en procesos de la mucosa hacia la luz del intestino, con forma de dedos (Genten, 2009).

d. Estudios toxicológicos

Para los ensayos de toxicología con peces, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) recomienda la utilización de especies cosmopolitas que estén disponibles durante todo el año, que sean fáciles de mantener en cautiverio, de manejar en los bioensayos y que históricamente se hayan usado en ensayos de toxicidad de sustancias químicas. En tal sentido, esta entidad propone una breve lista de especies recomendadas entre las que se encuentra *P. reticulata* (OECD, 2019). Esta especie se suele elegir para estudios de ecotoxicología debido a su pequeño tamaño, a su fácil mantenimiento en laboratorio y por presentar alta sensibilidad a distintos contaminantes (Antunes y col., 2017).

Tal como se describió para crustáceos, en peces se ha reportado que el DCF también inhibe la síntesis de prostaglandinas (Bhandari y Venables, 2011). Se ha descripto una toxicidad aguda relativamente baja en juveniles de varias especies, pero la exposición subcrónica a DCF suele afectar los riñones, el hígado y las branquias, observándose diversos efectos histopatológicos (Memmert, 2013).

Por su parte, se ha visto que el desarrollo de *P. reticulata* es afectado por la exposición a DCF, ya que se encontraron alteraciones esqueléticas, columna vertebral curvada y malformación de aletas caudales en juveniles de un día de vida expuestos a concentraciones

de entre 1 y 100 µg/L. Además, en branquias de juveniles se han encontrado alteraciones tales como hiperplasia, desprendimiento del tejido epitelial y lamelas secundarias dilatadas, dentro del rango de concentraciones de DCF mencionado anteriormente (Rifkana, 2019).

En este contexto, resulta de interés utilizar crustáceos y peces como modelos biológicos con el fin de evaluar los efectos del fármaco de uso masivo DCF sobre la reproducción y el desarrollo, además de posibles efectos histopatológicos en peces adultos.

Hipótesis y objetivos

En el marco del proyecto PUE (IBBEA, UBA-CONICET): “Desarrollo experimental de una cadena trófica modelo para evaluar los efectos de la biomagnificación de contaminantes ambientales” se propone:

Hipótesis de trabajo

La exposición subletal subcrónica al fármaco diclofenac causa: a) alteraciones en la reproducción y el desarrollo de *D. magna* y *P. reticulata*, b) histopatologías en branquias e hígado de hembras adultas de *P. reticulata*.

Objetivo general

Evaluar el impacto de la exposición subletal subcrónica al fármaco de uso humano y veterinario diclofenac mediante una valoración integral del potencial reproductivo y del desarrollo de la progenie en el crustáceo *D. magna* y en el pez de agua dulce *P. reticulata*. Adicionalmente, realizar estudios histopatológicos en *P. reticulata*.

Objetivos específicos (OE)

OE1 → Evaluar el efecto de la exposición subletal subcrónica al diclofenac sobre el potencial reproductivo de parentales de *D. magna* y sobre la incidencia de malformaciones en la progenie.

OE2 → Estudiar en hembras de *P. reticulata* los efectos sobre el potencial reproductivo y la incidencia de malformaciones en la progenie, inducidos por la exposición subletal subcrónica a diclofenac.

OE3 → Analizar en hembras de *P. reticulata* la condición de las branquias y el hígado luego de una exposición subletal subcrónica al fármaco diclofenac.

Materiales y métodos

Fármaco de ensayo

El fármaco utilizado fue el diclofenac sódico (*Diclofenac sodium salt*, D6899, Sigma-Aldrich), con pureza certificada del 98%. Número de CAS: 15307-79-6; Peso molecular: 318.13 g/mol.

Modelos biológicos

1) *Daphnia magna*

Los bioensayos de exposición a diclofenac (DCF) fueron planificados siguiendo los lineamientos del “*Daphnia magna reproduction test*” desarrollado por la OECD (2012). Brevemente, el objetivo de esta normativa es evaluar el efecto de las sustancias químicas sobre el potencial reproductivo de *D. magna*. Para ello, hembras de esta especie con menos de 24 h de edad se expusieron a la sustancia en estudio a diferentes concentraciones, de acuerdo con un diseño de ensayo semi-estático de 21 días de duración.

Cultivo y mantenimiento de animales

Los animales para los ensayos fueron seleccionados a partir de un cultivo propio de hembras mantenido en el Bioterio de Animales no Tradicionales (BANT) de la FCEyN, UBA, siguiendo los protocolos indicados por el servicio de Higiene y Seguridad, FCEN, UBA.

Los bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Fisiología de Crustáceos (DBBE, FCEN, UBA & IBBEA, UBA-CONICET). Dentro del laboratorio, el cultivo se mantuvo bajo un fotoperíodo de 14:10 (L:O) a temperatura ambiente, en una pecera de vidrio cilíndrica de 1,35 L de capacidad, conteniendo el medio de cultivo detallado en la Tabla 4. La composición de este medio de cultivo se basó en las sustancias listadas en el “*Daphnia magna reproduction test*” (OECD, 2012, núm. 211), a las concentraciones utilizadas en el medio COMBO de alta dureza (Baer y Goulden, 1998). Esta combinación fue la que mejor resultó para el mantenimiento de los animales. Durante el cultivo, los organismos fueron alimentados diariamente con algas *Scenedesmus vacuolatus* provistas por el laboratorio de la Dra. Ángela Juárez (Lab. de Biología de Protistas), investigadora integrante del proyecto PUE (IBBEA, UBA-CONICET).

Tabla 4. Composición química del medio de cultivo de *D. magna*.

Sustancia	Concentración final (mg/L)
Macronutrientes	
CaCl ₂ •2 H ₂ O	110,28
MgSO ₄	55,45
KCl	5,96
NaHCO ₃	126,0
Na ₂ SiO ₃ •9 H ₂ O	28,42
NaNO ₃	17,0
K ₂ HPO ₄	1,742
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	24,0
MnCl ₂ •4 H ₂ O	0,18
LiCl	0,31
RbCl	0,07
SrCl ₂ •6 H ₂ O	0,15
NaBr	0,016
Mo Na ₂ O ₄ •2 H ₂ O	0,022
CoCl ₂ •6 H ₂ O	0,01
KI	0,0033
Na ₂ EDTA•2 H ₂ O	4,36
FeSO ₄ •7 H ₂ O	1,0

Soluciones de ensayo

En este trabajo de tesis se realizó la exposición de las hembras a tres concentraciones subletales de DCF (10, 100 y 1000 µg/L), determinadas en base a ensayos piloto en esta especie, además de un control contenido solamente agua de dilución (libre del fármaco, con la misma composición que el medio de cultivo, ver Tabla 4). A partir de una solución madre de 0,1 g/L, se tomaron alícuotas que se diluyeron en los recipientes de ensayo, a fin de

obtener la serie final de concentraciones, siguiendo los lineamientos generales para la conducción de bioensayos con organismos acuáticos (APHA et al., 2005).

La solución madre del fármaco fue preparada al comienzo de cada semana de ensayo, a partir de la sal de DCF sódico, pesada en balanza analítica de precisión, con el agregado de agua destilada mediante pipeta graduada. No resultó necesario un vehículo para disolver la droga debido a que la solubilidad del DCF en agua supera las concentraciones utilizadas.

El recambio de las soluciones de ensayo se realizó tres veces por semana. Para determinar la frecuencia de recambio se tuvo en cuenta un trabajo previo del laboratorio en el que no se observó decaimiento del DCF dentro de las 72 h (Zanitti y col., 2023). El descarte de todas las soluciones se llevó a cabo de acuerdo a las normas vigentes de Higiene y Seguridad de la FCEN, UBA.

Selección de las hembras para el ensayo

La OECD (2012) indica la utilización de hembras con menos de 24 h de vida, manteniendo durante los ensayos las mismas condiciones utilizadas para el cultivo (luz, temperatura, medio, alimentación y número de animales por unidad de volumen). En caso de que las condiciones de ensayo difieran de las del cultivo, es aconsejable que se realice una aclimatación previa al ensayo de alrededor de tres semanas para evitar que las hembras sufran un estrés innecesario al cambiar las condiciones ambientales ni bien nacen. En el presente trabajo fue necesario realizar una aclimatación previa al ensayo, fue necesario realizar una aclimatación previa al ensayo, a fin de que los ejemplares no sufrieran un cambio brusco en las condiciones de luz y temperatura establecidas para los bioensayos.

Para la aclimatación, se seleccionaron parentales de pequeño tamaño (2 mm aproximadamente), en la primera semana de vida, sin haberse reproducido aún. Cada hembra seleccionada se individualizó en un recipiente de ensayo contenido 100 mL de medio control. Fueron alimentadas una vez por día, bajo las condiciones de luz y temperatura establecidas para el bioensayo, según se indica más abajo.

Siguiendo los protocolos de Wang y col. (2005) y de Liu y col. (2017), los neonatos que ingresaron al ensayo pertenecían a la tercera o cuarta camada de las hembras en aclimatación. Esto garantizó que los ejemplares que ingresaban al ensayo fueran hembras obtenidas por partenogénesis.

Diseño experimental

Se realizaron tres bioensayos utilizando 40 hembras de *D. magna* con menos de 24 h de edad. En los ensayos, las hembras fueron ubicadas al azar en cuatro tratamientos: 10, 100 y 1000 µg/L de DCF y un control libre de fármaco, con 10 réplicas por tratamiento. Cada hembra fue ubicada en un recipiente de vidrio conteniendo 100 mL de solución de ensayo. Los animales fueron alimentados diariamente con cantidades suficientes y equitativas de algas *S. vacuolatus*.

Durante la exposición de 21 días se registró el número de camadas, el tiempo transcurrido hasta cada eclosión y la mortalidad de los parentales. En cada eclosión y para cada unidad experimental se separó a los neonatos con menos de 24 h de vida colocándolos en una placa de Petri para registrar bajo lupa (Nikon SMZ645) la cantidad de neonatos por parental, las malformaciones externas y la mortalidad eventual. Luego, se calculó el porcentaje de malformaciones y la cantidad de neonatos muertos agrupando los valores de todas las réplicas de cada tratamiento. Además, se registró la longitud corporal de los parentales al finalizar el ensayo.

Si bien se pretendía que la exposición durase 21 días, al cabo de dos semanas del primer ensayo se registró una elevada mortalidad, probablemente debido a la temperatura implementada (23 °C), a las pipetas utilizadas, y/o a la procedencia de los parentales. Tal como se describe más adelante, se implementaron modificaciones para el segundo bioensayo. En este último, sin embargo, a los 16 días de exposición se registró nuevamente un alto grado de mortalidad, requiriendo una vez más la modificación de ciertas condiciones del ensayo. Finalmente, estos ajustes permitieron que en el tercer bioensayo se alcanzara el tiempo de exposición de 21 días tal como establece el protocolo de la OECD (2012). Para realizar la evaluación final, se consideraron los resultados de la exposición hasta el día 16 del segundo ensayo, mientras que del tercer ensayo se tomaron tanto los datos hasta el día 16 como hasta el día 21. Los datos del primer bioensayo no se tuvieron en cuenta para el análisis debido a que las condiciones experimentales eran muy diferentes a las de los últimos dos ensayos.

Una de las diferencias entre los tres bioensayos fue la procedencia de los neonatos. En el primer bioensayo, los neonatos provinieron de un mismo parental; en el segundo bioensayo, se contó con dos parentales que proveyeron 20 neonatos cada uno. Finalmente, en el último ensayo, los neonatos provinieron de 5 parentales diferentes (Figura 11). Estos ajustes se realizaron a los efectos de minimizar un posible sesgo asociado a la genética de los parentales.

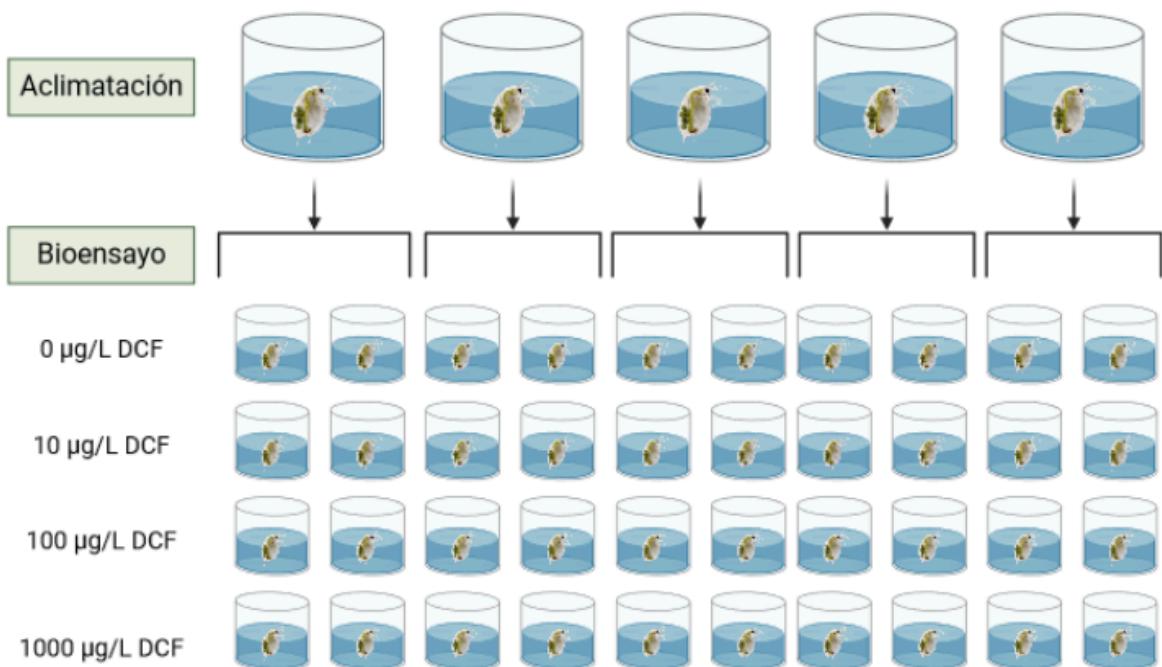


Figura 11. Esquema de la selección de hembras para el tercer bioensayo. Cinco parentales aportaron 8 hembras cada uno, repartiéndose equitativamente entre los tratamientos.

Por otro lado, en el segundo y tercer ensayo se modificó la temperatura e intensidad lumínica ambiental. Mientras que en el primer ensayo las réplicas se mantuvieron a temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y bajo una intensidad lumínica de 50-200 LUX, en los últimos dos ensayos los animales se mantuvieron dentro de una incubadora a $20,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y bajo una intensidad lumínica de 2000-2500 LUX (Figura 12A). Estos ajustes permitieron optimizar la sobrevida de los parentales. En todos los ensayos se conservó un fotoperíodo controlado de 14:10 (L:O).

Otros procedimientos experimentales fueron también optimizados en los diferentes ensayos, como fue el caso de las pipetas utilizadas para trasvasar a los ejemplares durante el recambio de medio y para separar a las crías. En los primeros dos ensayos se usaron pipetas Pasteur de plástico con punta de 1,5 mm de diámetro para separar a los neonatos y pipetas Pasteur de plástico con punta de 4 mm de diámetro para manipular a los parentales durante los recambios de medio. En el tercer ensayo, en cambio, para la separación de las crías se implementó el uso de pipetas Pasteur de vidrio con punta suavizada de 2 mm de diámetro y para el trasvase de los parentales, pipetas Pasteur de plástico con punta de 7 mm de diámetro (Figura 12B).

Otro ejemplo de optimización fue la técnica de fijación. En el primer bioensayo, los neonatos fueron fijados en formol al 2,5% antes de cumplir las 24 h de vida y la observación de las malformaciones se realizó una vez finalizado el ensayo. En cambio, en los últimos dos

ensayos los neonatos fueron examinados bajo lupa *in vivo* y luego fueron fijados en alcohol 96%, lo que redundó en una observación más precisa de las posibles malformaciones. En todos los casos, las hembras parentales fueron fijadas al finalizar el ensayo en la misma solución utilizada para los neonatos.

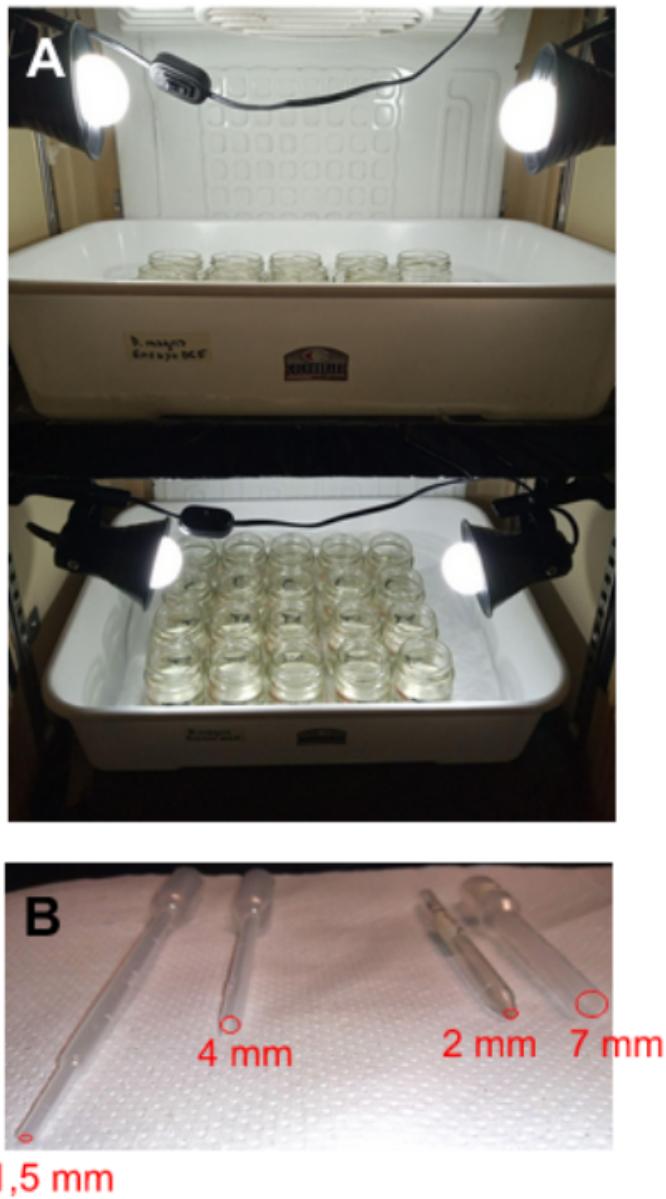


Figura 12. Fotografías del diseño experimental del bioensayo de *D. magna*. **A.** Vista de las réplicas dentro de la incubadora. **B.** Fotografías de las pipetas. De izquierda a derecha: pipeta Pasteur de plástico con punta de 1,5 mm de diámetro, pipeta Pasteur de plástico con punta de 4 mm de diámetro, pipeta Pasteur de vidrio con punta suavizada de 2 mm de diámetro, pipeta Pasteur de plástico con punta de 7 mm de diámetro.

Morfometría de las hembras

Al finalizar los ensayos cada parental fue fotografiado bajo microscopio digital Andonstar ADSM301 con el objeto de determinar el largo del cuerpo. La longitud del cuerpo

se definió como la distancia entre la parte superior de la cabeza y la base de la espina caudal, como se indica en la Figura 13. Las mediciones se realizaron utilizando el programa Image J.

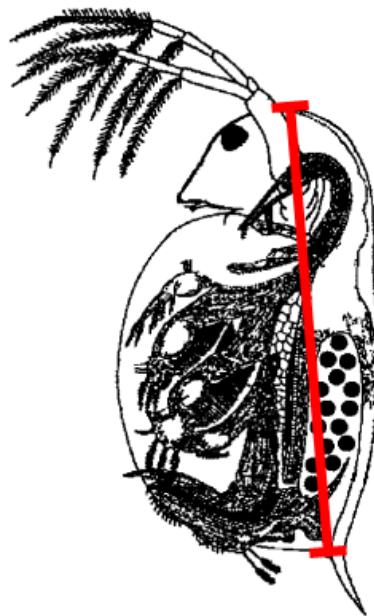


Figura 13. Medición de la longitud del cuerpo de los parentales. Esquema de una *D. magna* hembra donde se indica, con línea roja, la distancia medida para analizar el largo del cuerpo.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en *R core team* (versión 4.2.1, 2022). Las diferencias en la cantidad de crías según el tratamiento se analizaron de dos formas:

- **Acumulado:** siguiendo los lineamientos de la OECD (2012, núm. 211), se evaluó la diferencia en la **cantidad total** de crías por parental en cada tratamiento. Se tuvo en cuenta de dónde provino cada parental, agregándolo como una variable aleatoria. Se utilizó un modelo lineal generalizado mixto, dado que los datos presentaban distribución binomial negativa.
- **Promedio por camada:** se evaluó la **cantidad promedio** de crías por camada en cada tratamiento. Esto permitió independizar la cantidad de crías por camada y el número de camadas (que puede variar ligeramente). Se tuvo en cuenta de dónde provino cada parental, agregándolo como una variable aleatoria. Se utilizó un modelo lineal general, dado que los datos presentaban distribución normal.

La longitud del cuerpo de los parentales se analizó utilizando un modelo lineal general, dado que los datos presentaban distribución normal, y para este análisis también se tuvo en cuenta de dónde provino cada parental. Todas las variables mencionadas hasta aquí se

analizaron mediante ANOVA de una vía y contrastes de Dunnet (Sokal y Rohlf, 1981), a fin de evaluar diferencias entre grupos tratados y el control. En ningún caso fue necesario modelar la varianza puesto que se cumplió el supuesto de homocedasticidad.

El resto de las variables estudiadas (el tiempo transcurrido hasta la primera camada, el intervalo entre camadas, la cantidad de camadas por hembra, la mortalidad de los parentales, la mortalidad de neonatos y la incidencia de malformaciones en estos últimos) se analizaron mediante los test de Fisher, o bien de Chi-cuadrado para $N > 30$ (Sokal y Rohlf, 1981).

En todos los casos, se consideraron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$.

2) *Poecilia reticulata*

Cultivo y mantenimiento de los animales

Los ejemplares de *P. reticulata* utilizados en este trabajo de tesis fueron adquiridos en un acuario comercial local. Los peces se mantuvieron en cuarentena, en acuarios de vidrio de 50 L de capacidad, conteniendo agua declorada, con aireación continua y manteniendo un fotoperíodo de 14:10 (L:O) y una temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Se les enriqueció el ambiente mediante mallas plásticas. Los animales fueron alimentados diariamente *ad libitum* con alimento en escamas (TetraMin, Tropical Flakes, Tetra^(R)). Los ejemplares se mantuvieron un mes en la misma sala donde luego se realizaron los bioensayos dentro de las instalaciones del Laboratorio de Fisiología de Crustáceos.

Soluciones de ensayo

Se realizó la exposición de las hembras a tres concentraciones subletales de DCF tomando alícuotas de 10, 100 o 1000 μL de solución madre (con una concentración de 1,75 g/L) que se diluyeron en 1,75 L de agua de dilución (agua de red declorada, con una dureza de 80 mg/L como equivalentes de CaCO₃) para obtener las diferentes soluciones de ensayo: 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$ de DCF (determinadas en base a resultados previos del Lab. de Ecotoxicología Acuática (DBBE, FCEN, UBA & IBBEA, UBA-CONICET). Además, se realizó un control en agua de dilución (libre de fármaco).

La preparación de la solución madre se llevó a cabo de la misma forma que se describió previamente. La renovación de las soluciones de ensayo se realizó una vez por

semana teniendo en cuenta resultados previos del laboratorio con otras especies de peces. El descarte de las soluciones se efectuó de acuerdo a las normas vigentes de Higiene y Seguridad de la FCEN, UBA.

Selección de las hembras para el ensayo

Se seleccionaron 20 hembras del stock mantenido en el laboratorio, de tamaño corporal similar, con abdomen de forma cúbica (indicador de gravidez). Estos peces fueron ubicados individualmente en los acuarios de vidrio de ensayo, realizando una aclimatación previa al ensayo de una semana, bajo las condiciones del control experimental.

Se buscó que las hembras que ingresaron al ensayo presentaran indicios de gravidez puesto que se pretendía que durante la exposición nacieran dos camadas: la primera, gestada casi por completo en condiciones control, y la segunda, gestada completamente bajo exposición a DCF, en la que se analizaría la incidencia de malformaciones.

Diseño experimental

Se realizó un bioensayo con cuatro tratamientos (control y tres concentraciones de DCF). Debido a que las hembras no tuvieron el comportamiento de puesta esperado, solo una tuvo dos camadas, mientras que el resto tuvo una sola camada o ninguna. Por lo tanto, se estableció una duración de 10 semanas de exposición. Para ello, se partió de hembras que se identificaron como grávidas y que fueron asignadas al azar a los tratamientos, con 5 réplicas por tratamiento. Cada hembra se dispuso de manera individual en un acuario de vidrio conteniendo 1,75 L de solución de ensayo. Con el fin de homogeneizar la temperatura entre las réplicas, los acuarios se agruparon en baños (bandejas blancas) con agua a una temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Las peceras se separaron entre sí por redes plásticas para disminuir la visibilidad entre acuarios, debido a que se observó una tendencia a que los animales quisieran juntarse cuando veían a su conespecífico. Cada bandeja fue cubierta con una malla de plástico para evitar posibles pérdidas por salto de los peces en ensayo (Figura 14). Los animales se mantuvieron bajo un fotoperíodo de 14:10 (L:O) con una intensidad lumínica de 50-200 LUX. Los peces fueron alimentados diariamente hasta la saciedad con alimento en escamas (TetraMin, Tropical Flakes, Tetra^(R)).

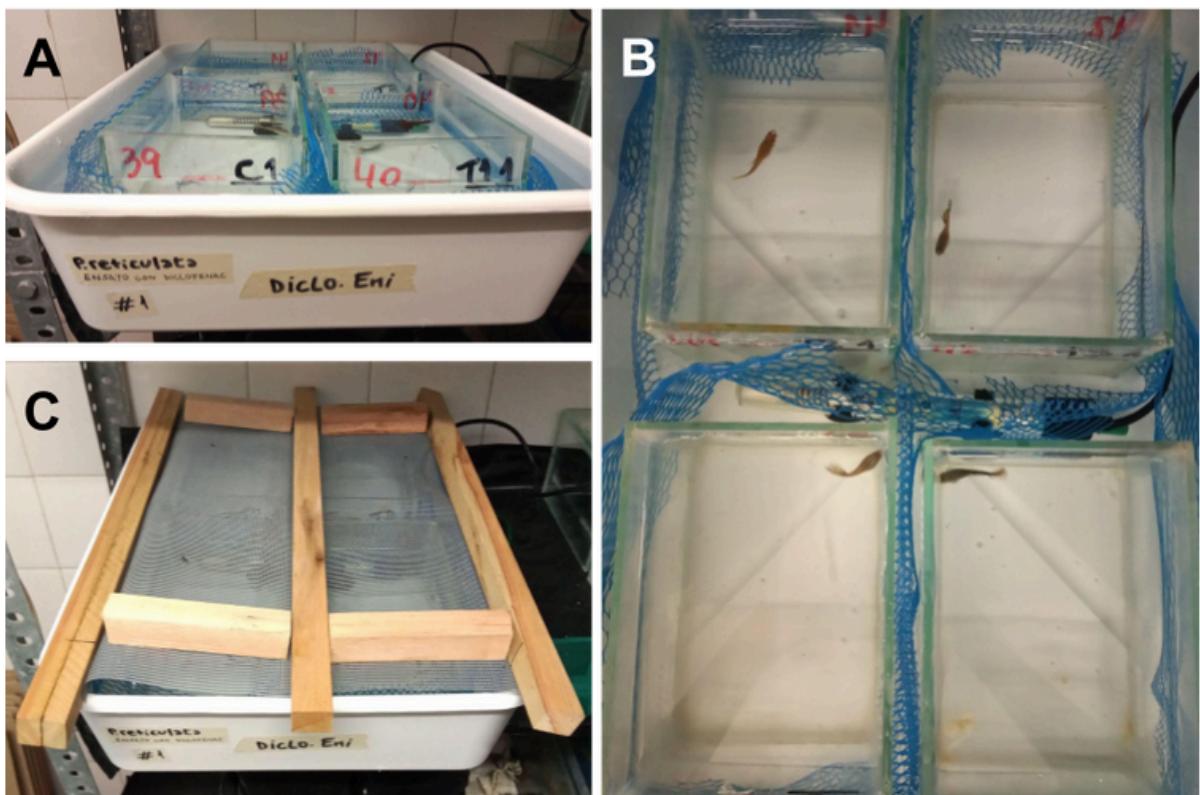


Figura 14. Fotografías del diseño experimental del bioensayo de *P. reticulata*. A y B. Diferentes vistas de una de las 5 bandejas del bioensayo. Cada bandeja albergó una réplica de cada tratamiento. **C.** Fotografía mostrando la malla de plástico que cubría la bandeja.

Los juveniles que nacieron durante el ensayo fueron retirados inmediatamente para evitar que disminuya la concentración de DCF en la solución y para impedir el canibalismo parental (Deacon, 2023). No se agregaron refugios para las crías, a fin de evitar la pérdida del compuesto ensayado por adsorción a otros materiales. Sin embargo, dado que se observó que las hembras no se alimentan en el periodo cercano a la puesta, la separación de los juveniles del parental el día de la puesta fue suficiente para evitar la depredación. Los parámetros evaluados fueron la mortalidad de los parentales, el número de puestas (camadas), la cantidad de crías por camada, y la incidencia de malformaciones en estas crías una vez fijadas (observadas bajo lupa Zeiss Stemi 305, acoplada a una cámara Axiocam 105 color). El largo estándar de las crías se midió utilizando el programa Image J.

Asimismo, al finalizar la exposición se registraron varios parámetros morfométricos de las hembras que llegaron vivas al final del ensayo. Para ello, cada ejemplar fue pesado con balanza de precisión y posteriormente fue colocado en posición lateral para determinar el largo estándar con calibre. A partir de los parámetros morfométricos registrados se calculó el factor de condición utilizando la ecuación 1.

$$K = \frac{Peso}{L st^3} \cdot 100 \quad (1)$$

donde K: factor de condición y L st: largo estándar.

Cuando K es mayor o igual a 1, la relación largo-peso indica que el adulto se encuentra en condiciones óptimas (Lawal, 2020).

Por otro lado, se estudió mediante técnicas histológicas e histoquímicas el efecto de la exposición a DCF sobre distintos órganos de los parentales: branquias, hígado y ovario.

Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normativas sobre el cuidado y uso de animales en la investigación (peces), acorde con el Comité de Ética local (Protocolo 103/2018; Dra. F. Lo Nstro (CICUAL, FCEN, UBA).

Tanto las crías nacidas durante el ensayo como los parentales fueron sacrificados por inmersión en un baño de agua-hielo, dejando pasar 10 minutos luego del cese del movimiento opercular, tal como recomienda la normativa de la CICUAL para peces tropicales chicos. Posteriormente, los ejemplares se fijaron en solución de Bouin por 24 h y luego se transfirieron a alcohol 70% para posterior análisis histológico.

Técnicas histológicas

A continuación, se describen los pasos del procesamiento de las muestras para su análisis histológico.

1. Fijación

Al finalizar el ensayo se sacrificó a las hembras de *P. reticulata* sumergiéndolas en un baño de agua/hielo, tal como se mencionó previamente. Luego, con un bisturí se separó la cabeza por debajo del opérculo y la cola justo por detrás del ano, mientras que el tronco se cortó en dos porciones de similar tamaño (Figura 15). Se fijaron la cabeza y las dos porciones de tronco en solución de Bouin por 24 h y luego todas las muestras fueron pasadas a alcohol 70% hasta su procesamiento histológico.

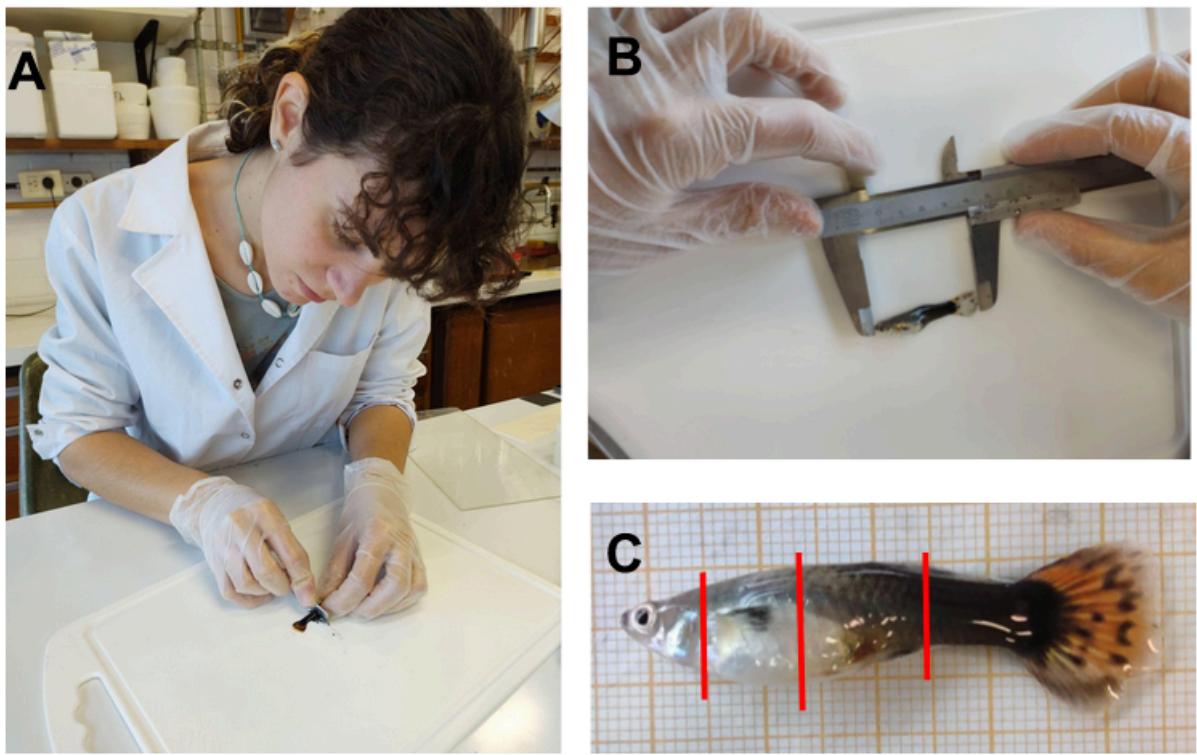


Figura 15. Procesamiento de los ejemplares para el análisis histológico. A. Fotografía del proceso de corte con cuchilla previo a la fijación. B. Fotografía del proceso de medición del tamaño de los ejemplares previo a la fijación. C. Fotografía de un ejemplar en la que se indican los planos de corte transversal.

2. Deshidratación

Las piezas fueron deshidratadas para su posterior inclusión en parafina de acuerdo al siguiente esquema:

Alcohol 90°	80 minutos
Alcohol 96°	80 minutos
Alcohol 100°	35 minutos
Xilol	15 minutos

3. Inclusión en parafina

Las piezas ya deshidratadas se mantuvieron en estufa durante 6h en parafina líquida (Paraplast®, punto de fusión 60°C). Luego de solidificar la parafina, se procedió a tallar los bloques y montarlos sobre tacos de madera de 2,5 cm² de superficie (Figura 16A).

4. Corte en micrótomo de rotación

Se utilizó un micrótomo de rotación Leica (RM2125RTS) para realizar cortes de 7 µm de espesor (Figura 16B). Los cortes fueron colocados sobre portaobjetos gelatinizados previamente y se dejaron secar y estirar 10 minutos en estufa a 60°C.

Para gelatinizar los portaobjetos se utilizó 2 g de gelatina y 0,1 g de alumbre de cromo disueltos en 200 mL de agua destilada.

5. Desparafinado e hidratación

Luego se procedió a desparafinizar e hidratar los cortes, a fin de realizar coloraciones histológicas de acuerdo con el siguiente esquema:

Xitol I	3 minutos
Xitol II	3 minutos
Alcohol 100°	2 minutos
Alcohol 96°	2 minutos
Alcohol 90°	2 minutos
Alcohol 70°	2 minutos
Alcohol 50°	2 minutos
Agua destilada	2 minutos

6. Coloraciones

Se realizaron dos tipos de coloraciones sobre los cortes de cabeza a la altura de las branquias, a saber: coloración topográfica policrómica tricrómico de Masson y Azul Alcian (Figura 16C). En los cortes de tronco solo se realizó la coloración tricrómico de Mason.

a. Protocolo de coloración Tricrómico de Masson modificado

Se procedió de acuerdo con el siguiente esquema:

Hematoxilina de Carazzi	9 minutos
Agua de la canilla (para el viraje de color)	1 minuto
Agua destilada (para lavar)	1 minuto
Fucsina	1 minuto + 20 segundos
Agua destilada (para lavar)	1 minuto
Ácido fosfomolibdico (mordiente para el siguiente colorante)	4 minutos + 30 segundos
Azul de Anilina	3 minutos
Agua destilada (3 lavados)	1 minuto

Resultados: núcleos violetas, citoplasma rojizo, fibras de colágeno azul intenso, cartílago, mucus y matriz azul claro.

b. Azul Alcian

El esquema utilizado fue el siguiente:

Azul Alcian pH 3,5	25 minutos
Agua de la canilla (para lavar)	lavado
Hematoxilina de Carazzi	9 minutos
Agua de la canilla (para el viraje de color)	1 minuto
Agua destilada (3 lavados)	1 minuto

Resultados: glucoconjungados ácidos en azul

7. Deshidratación

Luego de la coloración correspondiente, los cortes fueron deshidratados para su posterior montaje, de acuerdo con el siguiente esquema:

Alcohol 70°	1 minuto
Alcohol 90°	1 minuto
Alcohol 96°	1 minuto
Alcohol 100°	1 minuto
Xilol I	1 minuto
Xilol II	1 minuto

8. Montaje

Una vez concluida la deshidratación, los portaobjetos fueron retirados del xilol, se les aplicó Bálsamo de Canadá sintético Biopack® y se les colocó a cada uno un cubreobjeto limpio. Se eliminaron las burbujas aplicando una suave presión sobre el cubreobjeto, dejándolos secar bajo campana por al menos 24 h.



Figura 16. Fotografías del proceso de preparación de los cortes histológicos. A. Preparación de los bloques luego de la inclusión en parafina. B. Sala donde se realizaron los cortes en micrótomo. De derecha a izquierda: platina termorregulada, micrótomo de rotación, microscopio donde se observaron los cortes. C. Ejemplo del proceso de coloración utilizando *couplins*.

Análisis histológico

Los cortes fueron observados bajo un microscopio óptico Zeiss Axioplan y fotografiados con una cámara digital acoplada Axiocam ERc5s. Los preparados histológicos fueron analizados a la altura de la cavidad faríngea, evaluando la presencia de histopatologías branquiales, tales como levantamiento y/o engrosamiento del epitelio de las lamelas, y aumento de la vascularización, entre otros (siguiendo a Mallatt, 1985). Por otra parte, se analizaron los cortes del tronco considerando diferentes órganos como el hígado y el ovario. Se determinó la presencia de daño hepático, como reducción de las reservas de glucógeno, agregados de melanomacrófagos y presencia de espacios intercelulares (Schwarz y col., 2017). Asimismo, se evaluaron los ovarios, donde se determinó la presencia de embriones, así como el estadio de maduración gonadal, identificando el estadio de maduración de los oocitos (Lambert, 1970; Genten, 2009; Brown Peterson y col. 2011).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en *GraphPad Prism* (versión 8.0.1, 2018). El largo estándar, el peso y el factor de condición se analizaron mediante ANOVA de una vía, a fin de evaluar diferencias entre grupos tratados y el control. Los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. La mortalidad y el número de hembras que tuvieron puestas se analizaron mediante el test de Fisher (Sokal y Rohlf, 1981). El largo estándar de las crías se analizó mediante T-test.

En todos los análisis se consideraron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$.

Resultados

Daphnia magna

Parámetros morfométricos, reproductivos y mortalidad

El tiempo hasta la primera eclosión, los intervalos entre camadas, el número de camadas por parental y la mortalidad de las hembras se detallan en la Tabla 5. Se puede observar que en el segundo bioensayo los valores de estos parámetros no muestran diferencias entre tratamientos. Por otro lado, en el tercer bioensayo, si bien se observa más variabilidad, tampoco se observan diferencias entre tratamientos de los parámetros arriba mencionados.

Tabla 5. Parámetros morfométricos, reproductivos y mortalidad. Resultados de los últimos dos bioensayos respecto al tiempo transcurrido hasta la primera camada (en días), el intervalo entre camadas (en días), la cantidad de camadas por hembra y la mortalidad de los parentales. No se hallaron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0,05$).

	[DCF] ($\mu\text{g/L}$)			
	0	10	100	1000
Segundo bioensayo (hasta el día 16)				
Tiempo hasta la 1 ^a camada (días)	8-9	8-9	8-9	8-9
Intervalo entre camadas (días)	3-4	3-4	3-4	3
Cantidad de camadas por hembra	3	3	3	3
Mortalidad (individuos muertos)	0	0	0	0
Tercer bioensayo (hasta el día 16)				
Tiempo hasta la 1 ^a camada (días)	7-10	7-9	7-9	8-10
Intervalo entre camadas (días)	3-4	3-4	3-4	3-4
Cantidad de camadas por hembra	3	3	3-4	3
Mortalidad (individuos muertos)	0	1	0	0
Tercer bioensayo (hasta el día 21)				
Tiempo hasta la 1 ^a camada (días)	7-10	7-9	7-9	8-10
Intervalo entre camadas (días)	3-4	3-5	3-4	3-4
Cantidad de camadas por hembra	4-5	4-5	4-5	4-5

Mortalidad (individuos muertos)	0	1	1	1
---------------------------------	---	---	---	---

La longitud de las hembras al finalizar el tercer ensayo no mostró diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p=0,0731$). Sin embargo, se observó una tendencia hacia menores tallas corporales en los grupos tratados con DCF (Figura 17). Cabe aclarar que la longitud del cuerpo inicial no fue significativamente diferente entre los parentales de cada tratamiento, con un valor de $0,91 \pm 0,03$ mm (media \pm desvío estándar).

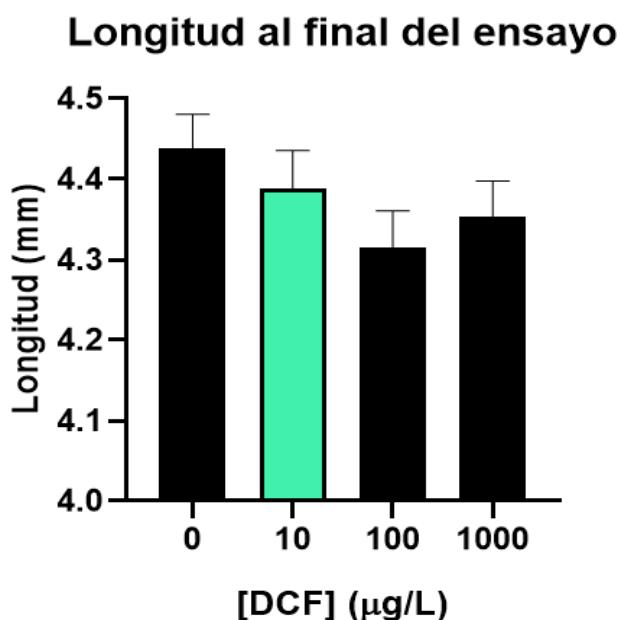


Figura 17. Longitud (mm) del cuerpo de las hembras al día 21 del tercer ensayo. Se muestra la media y error estándar para cada tratamiento (0, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$ de DCF). En color verde se destaca la concentración más parecida a los reportes ambientales. No se hallaron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0731$).

La cantidad total de crías por parental a lo largo de cada ensayo no mostró diferencias significativas respecto de los tratamientos (ANOVA, los p-valores se indican en la Figura 18).

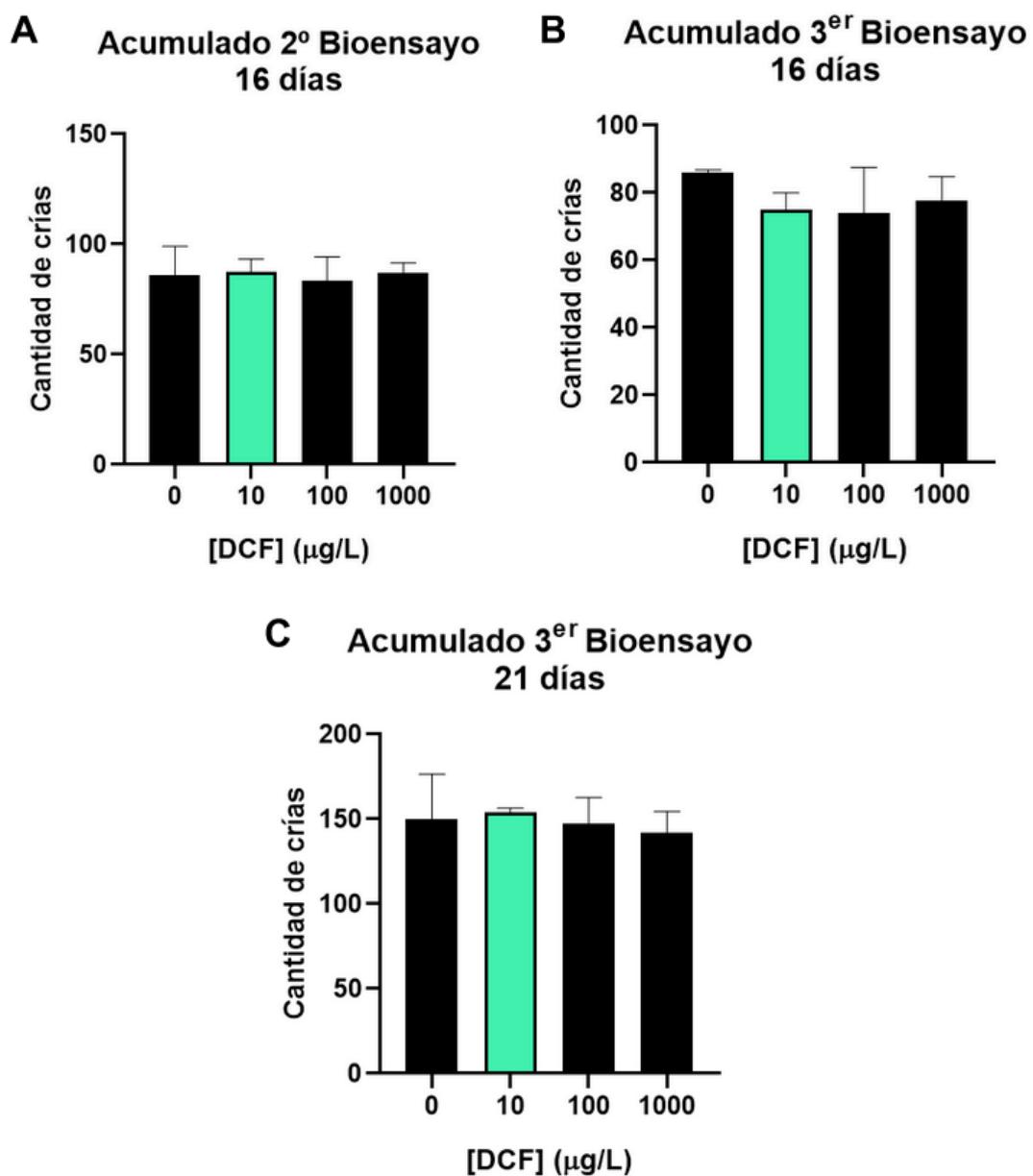


Figura 18. Cantidad total (i.e. acumulado) de crías a lo largo de los ensayos. Se muestra la mediana y rango intercuartil para cada tratamiento (0, 10, 100 y 1000 µg/L de DCF). En color verde se destaca la concentración más parecida a los reportes ambientales. No se hallaron diferencias significativas entre tratamientos. **A.** Cantidad total de crías por tratamiento en el segundo bioensayo tomando los datos hasta el día 16 (ANOVA, $p=0,7444$). **B.** Cantidad total de crías por tratamiento en el tercer bioensayo tomando los datos hasta el día 16 (ANOVA, $p=0,1509$). **C.** Cantidad total de crías por tratamiento en el tercer bioensayo tomando los datos de todo el ensayo (ANOVA, $p=0,2132$).

El promedio de crías por camada no mostró diferencias significativas entre tratamientos en el segundo bioensayo (Figura 19A) ni en el tercer bioensayo a los 21 días

(Figura 19C), pero sí en el tercer bioensayo al día 16 (ANOVA, $p=0,0493$, Figura 19B). Los contrastes de Dunnet develaron que el promedio de crías del control fue significativamente mayor al promedio de crías de cada tratamiento con DCF (Control-10 $\mu\text{g/L}$: $p=0,0202$; Control-100 $\mu\text{g/L}$: $p=0,0376$; Control-1000 $\mu\text{g/L}$: $p=0,0374$).

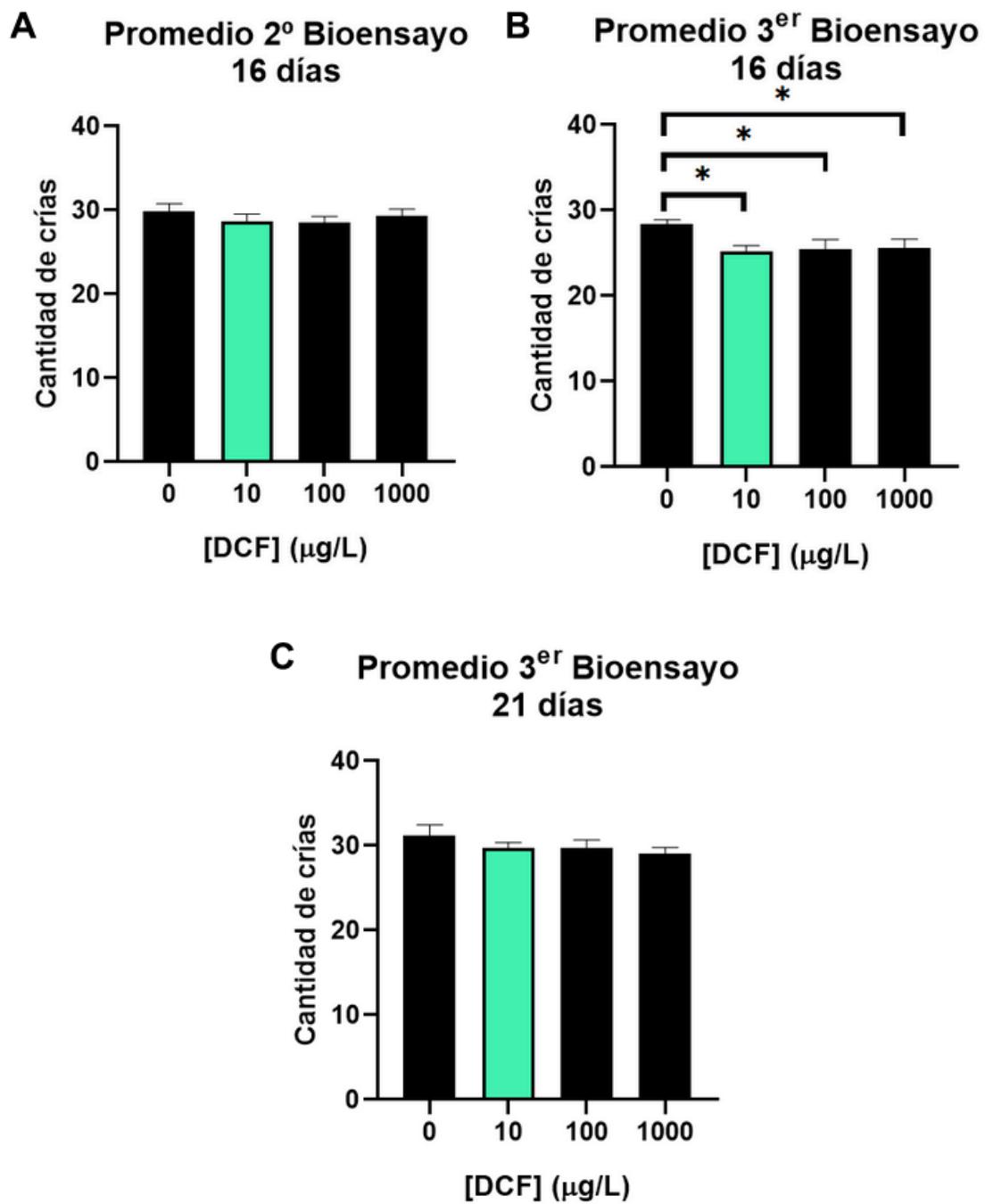


Figura 19. Promedio de crías por camada. Se muestra la media y error estándar para cada tratamiento (0, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$ de DCF). En color verde se destaca la concentración más parecida a los reportes ambientales. No se hallaron diferencias significativas entre tratamientos. **A.** Promedio de crías por camada en cada tratamiento del segundo bioensayo al día 16 (ANOVA, $p=0,4228$). **B.** Promedio de crías por camada en cada tratamiento del tercer bioensayo al día 16 (ANOVA, $p=0,0493$). **C.** Promedio de crías por camada en cada tratamiento del tercer bioensayo al día 21 (ANOVA, $p=0,2995$). * $p<0,05$ obtenido por contrastes de Dunnet.

Calidad de la progenie

El registro de malformaciones y mortalidad de los neonatos se exhibe en la Figura 20. Respecto a la mortalidad, sólo se encontraron diferencias significativas para el segundo ensayo (Chi-cuadrado, $p=0,0104$) entre la concentración más alta y el control (Figuras 20 A y B). En el tercer bioensayo a los 16 días no se registró ningún neonato muerto.

Respecto de las malformaciones registradas en el segundo ensayo, se observaron ejemplares con antenas atrofiadas (antenas sin ramificar, dobladas, sin extender o inmóviles) que generalmente presentaban aparejada cierta dificultad motriz, tal como natación descoordinada y/o impedimento total de la natación. Asimismo, se observó que aquellos neonatos expuestos a DCF presentaron la espina caudal curvada (hacia ventral, hacia dorsal o hacia algún lateral) o directamente ausente, con diferencias significativas respecto al control en los tratamientos de 10 y 1000 $\mu\text{g/L}$ DCF (Chi-cuadrado, Control-10 $\mu\text{g/L}$: $p=0,0415$; Control-100 $\mu\text{g/L}$: $p=0,0766$; Control-1000 $\mu\text{g/L}$: $p=0,0440$). En la concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ DCF se observó un pequeño porcentaje de ejemplares de forma esférica que se presume eran organismos con desarrollo arrestado. En el lote de 1000 $\mu\text{g/L}$ DCF, un grupo de neonatos presentó el ojo sin su pigmentación característica (Figura 20C). En la Figura 21 se ejemplifican las anomalías corporales registradas en los ensayos.

La malformación predominante en el tercer bioensayo fue la curvatura de la espina caudal, aunque no se detectaron diferencias significativas con el control (Chi-cuadrado, $p>0,05$). La proporción de atrofia de antenas y de dificultad motriz disminuyó en el tercer bioensayo con respecto al segundo. Además, en este bioensayo la atrofia en los ojos y el arresto del desarrollo se registró en la menor concentración de DCF (Figuras 20 D y E).

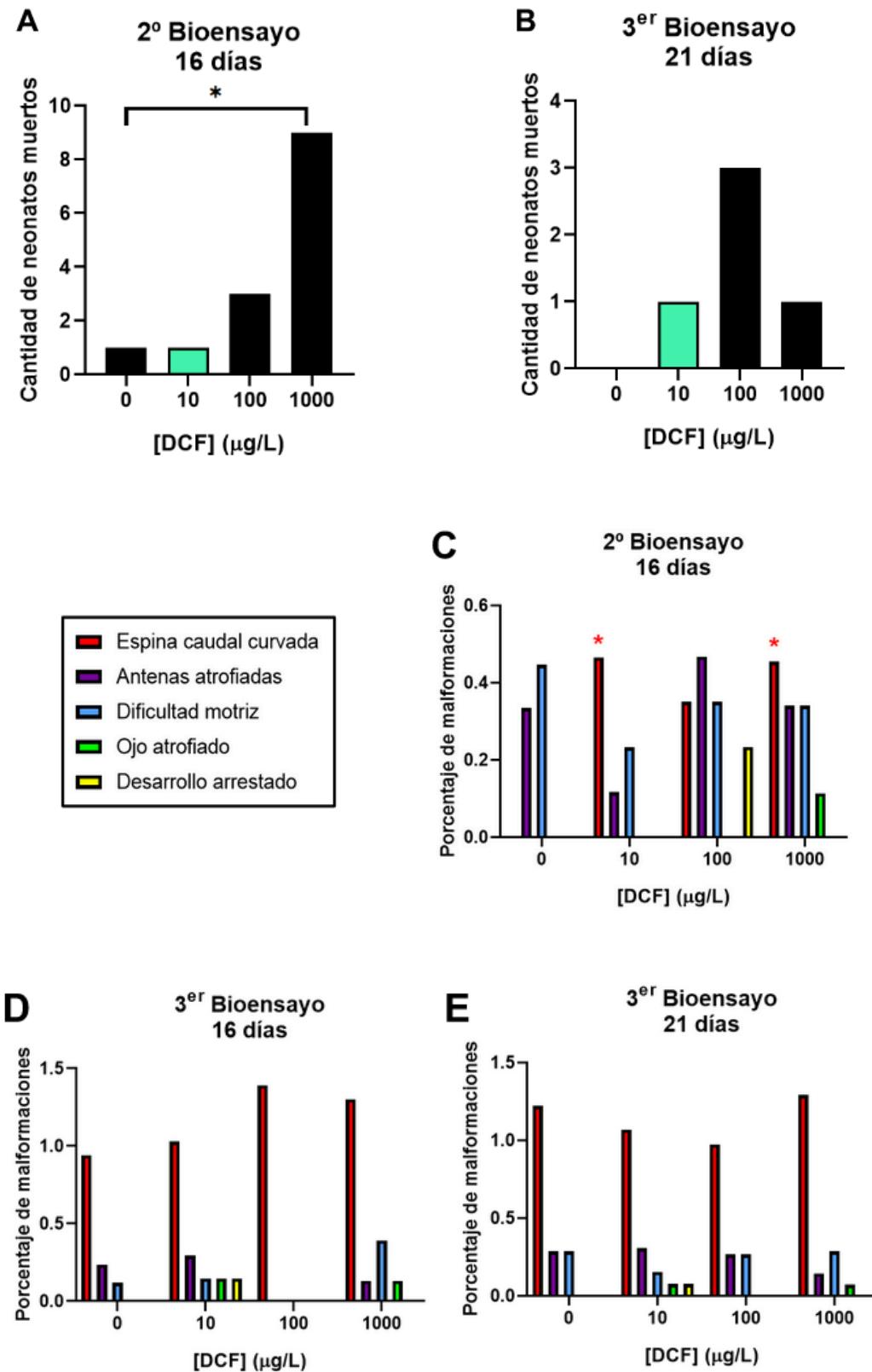


Figura 20. Calidad de la progenie. A y B. Cantidad de neonatos hallados muertos al momento del recuento, para cada tratamiento (0, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$ de DCF). En color verde se destaca la concentración más parecida a los reportes ambientales. C, D y E. Proporción de neonatos con malformaciones (en porcentaje) respecto al total de neonatos en cada tratamiento. * diferencias significativas respecto al control obtenidas mediante la prueba de Chi-cuadrado.

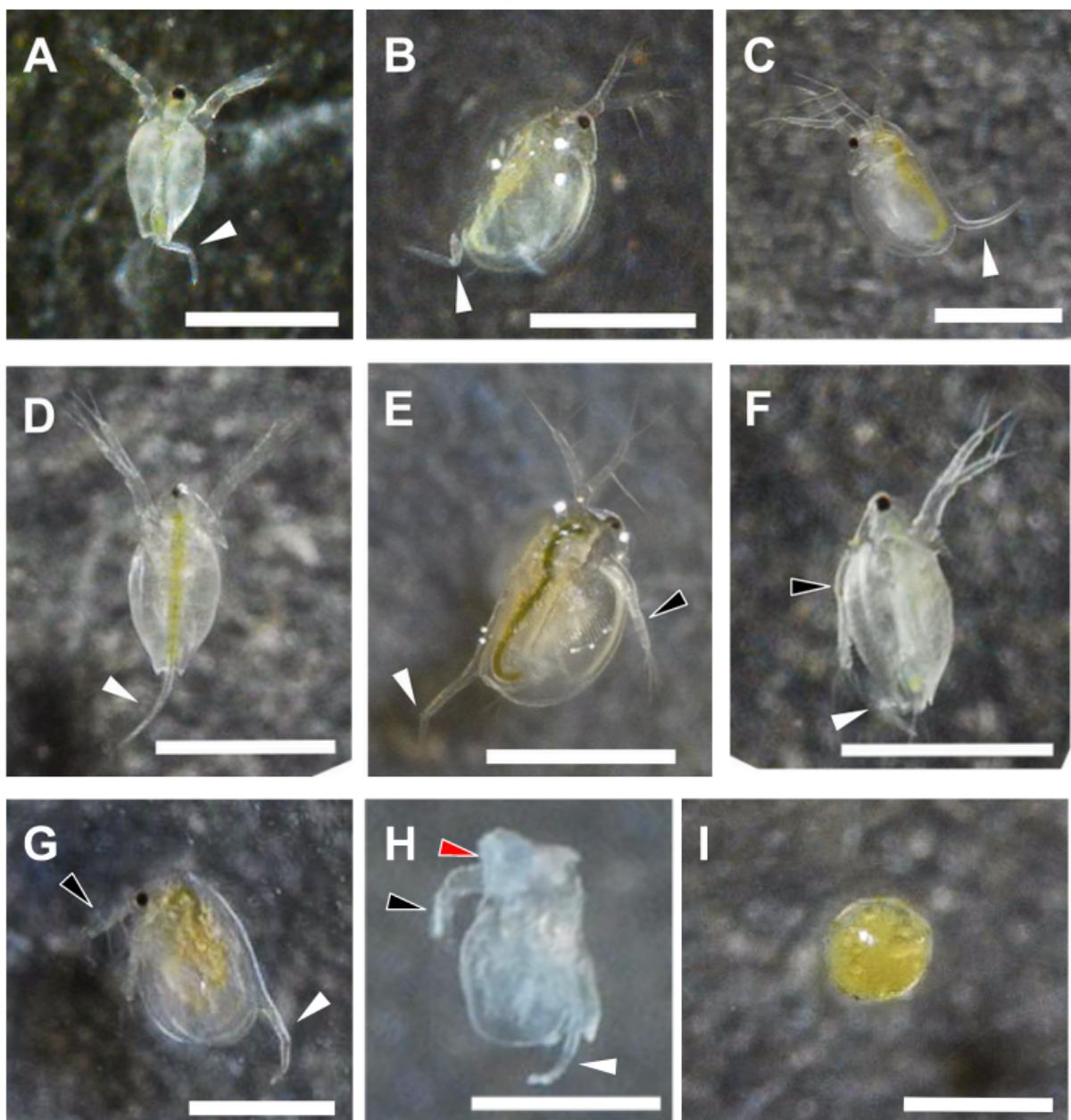


Figura 21. Morfologías corporales anómalas de los neonatos registradas durante los bioensayos. Las puntas de flecha blancas señalan malformaciones en espina caudal. Las puntas de flecha negras indican malformaciones en antenas. La punta de flecha roja señala ausencia de pigmentación del ojo. **A.** Vista ventral de un neonato con espina caudal doblada. **B.** Vista lateral con espina caudal doblada. **C.** Vista lateral con espina caudal curvada hacia dorsal. **D.** Vista ventral con espina caudal curvada hacia un lateral. **E.** Vista lateral con espina caudal doblada y una antena plegada sin ramificar. **F.** Vista ventral con espina caudal doblada y una antena plegada sin ramificar. **G.** Vista lateral con espina caudal curvada hacia ventral y ambas antenas plegadas sin ramificar. **H.** Vista ventro-lateral con espina caudal curvada hacia ventral, antenas sin ramificar y ausencia de pigmentación en el ojo. **I.** Neonato con forma esférica que se presume como un organismo con el desarrollo arrestado. 0,5 mm. Barras: A-G: 1mm; H-I: 0,5 mm.

Poecilia reticulata

Parámetros morfométricos y mortalidad

En la Tabla 6 se informan los datos de largo estándar (Lst) y peso total (P) al final del ensayo, así como el porcentaje de mortalidad en cada tratamiento. Además, se indica el valor del factor de condición (K) calculado a partir del Lst y del P.

Tabla 6. Parámetros morfométricos de las hembras parentales. N inicial= 5 en cada tratamiento. Ns= número de sobrevivientes a las 10 semanas de ensayo.

[DCF] ($\mu\text{g/L}$)	Ns	Largo estándar (cm)		Peso (g)		Factor de condición		Mortalidad (%)
		Media	E.E.	Media	E.E.	Media	E.E.	
0	5	3,42	0,10	0,98	0,11	2,43	0,11	0
10	4	3,28	0,20	0,72	0,09	2,07	0,21	20
100	5	3,42	0,17	0,90	0,09	2,28	0,23	0
1000	2	3,52	0,14	1,10	0,14	2,48	0,04	60

El largo estándar y el peso de los parentales al final del ensayo se analizaron mediante ANOVA y no se encontraron diferencias significativas ($p=0,7528$ y $p=0,1199$ respectivamente). El factor de condición resultó ser mayor a 1 en todos los tratamientos y no se encontraron diferencias significativas entre éstos (ANOVA, $p=0,3629$). Si bien se observó una tendencia a un mayor porcentaje de mortalidad en el tratamiento con la mayor concentración de DCF, no se detectaron diferencias significativas con el control (Fisher, $p=0,0833$).

Observaciones comportamentales

A lo largo del ensayo se registraron comportamientos llamativos de 2 ejemplares expuestos a 10 $\mu\text{g/L}$ DCF y 4 ejemplares expuestos a 1000 $\mu\text{g/L}$ DCF. El principal comportamiento registrado fue el salto de los individuos hacia fuera de la pecera cuando se levantaban las mallas de plástico para el recambio de medio. Otras observaciones consistieron en nado rápido, agitación y mayor dificultad para atrapar al animal con la red en el recambio (hiperexcitación).

Histopatología de órganos

En la Figura 22 se muestra una imagen topográfica de la cabeza de un ejemplar control y el detalle de los filamentos branquiales. Se observó una gran cantidad de filamentos branquiales a la altura a la cual se realizó el corte, dentro de una cámara branquial delimitada por el opérculo y por los órganos internos (Figura 22A). Se identificó el soporte cartilaginoso que sostiene cada filamento primario y las numerosas lamelas secundarias que contiene cada filamento primario (Figuras 22 B y C). Se reconoció la estructura de la lamela secundaria y los diferentes tipos celulares que la conforman: las células planas del epitelio lamelar, los núcleos basófilos y pequeños de las células pilares, y los eritrocitos nucleados con una tonalidad naranja y forma ovalada, contenidos dentro de las lagunas sanguíneas delimitadas por las células pilares, o bien en el canal marginal (extremo de las lamelas). En los espacios interlamelares se observaron las células mucosas con núcleos grandes y cromatina laxa, y las células de cloro con núcleos más chicos que los anteriores, más basófilos y con citoplasma abundante (Figura 22D).

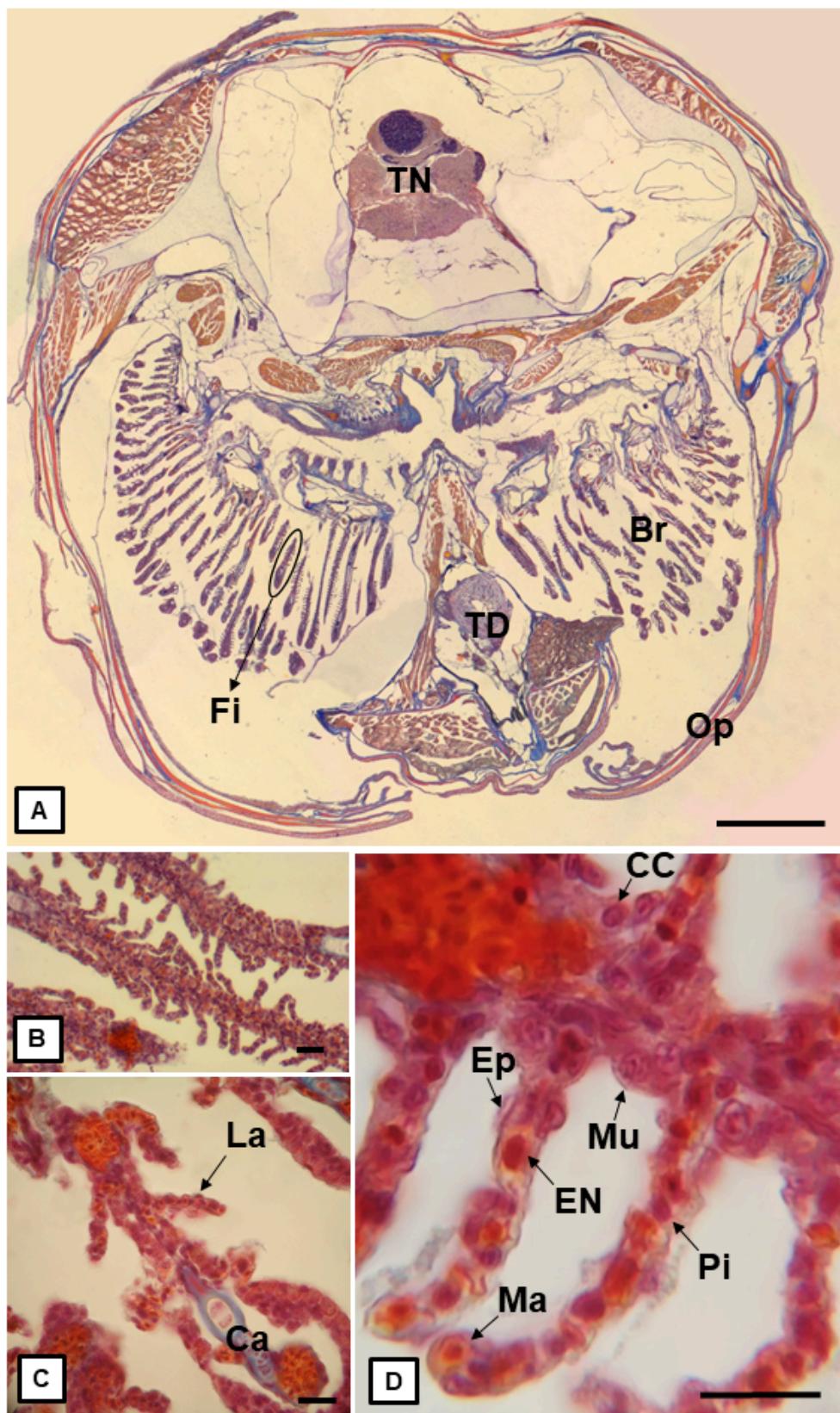


Figura 22. Corte transversal de la cabeza a la altura del opérculo (A), y detalle de los filamentos branquiales (B, C y D). A: imagen topográfica de la cabeza en corte transversal. B: 3 filamentos branquiales. C: detalle de un filamento branquial. D: detalle de las lamelas secundarias. Abreviaturas: branquias (Br), canal marginal (Ma), célula de cloro (CC), célula epitelial (Ep), célula mucosa (Mu), célula pilar (Pi), filamento branquial primario (Fi), eritrocito nucleado (EN), lamela secundaria (La), soporte cartilaginoso (Ca), tubo digestivo (TD), tubo neural (TN). Barras: A: 500 µm; B-D: 20 µm.

El examen histológico de las branquias develó varias alteraciones histopatológicas en los tratamientos con DCF (Figura 23). En las tres concentraciones de DCF ensayadas se detectó desprendimiento del epitelio de las lamelas secundarias (Figura 23A). En algunos ejemplares se encontró una mayor irrigación de estas lamelas, respetando la estructura de célula pilar y laguna sanguínea, pero con una mayor abundancia de eritrocitos en cada laguna (Figura 23B), mientras que en otros organismos este efecto se vio exacerbado por la ruptura de las células pilares, originando el ensanchamiento de las lagunas sanguíneas (telangiectasias) (Figura 23C). En la concentración de 1000 µg/L además se identificó la fusión de lamelas secundarias (Figura 23 D).

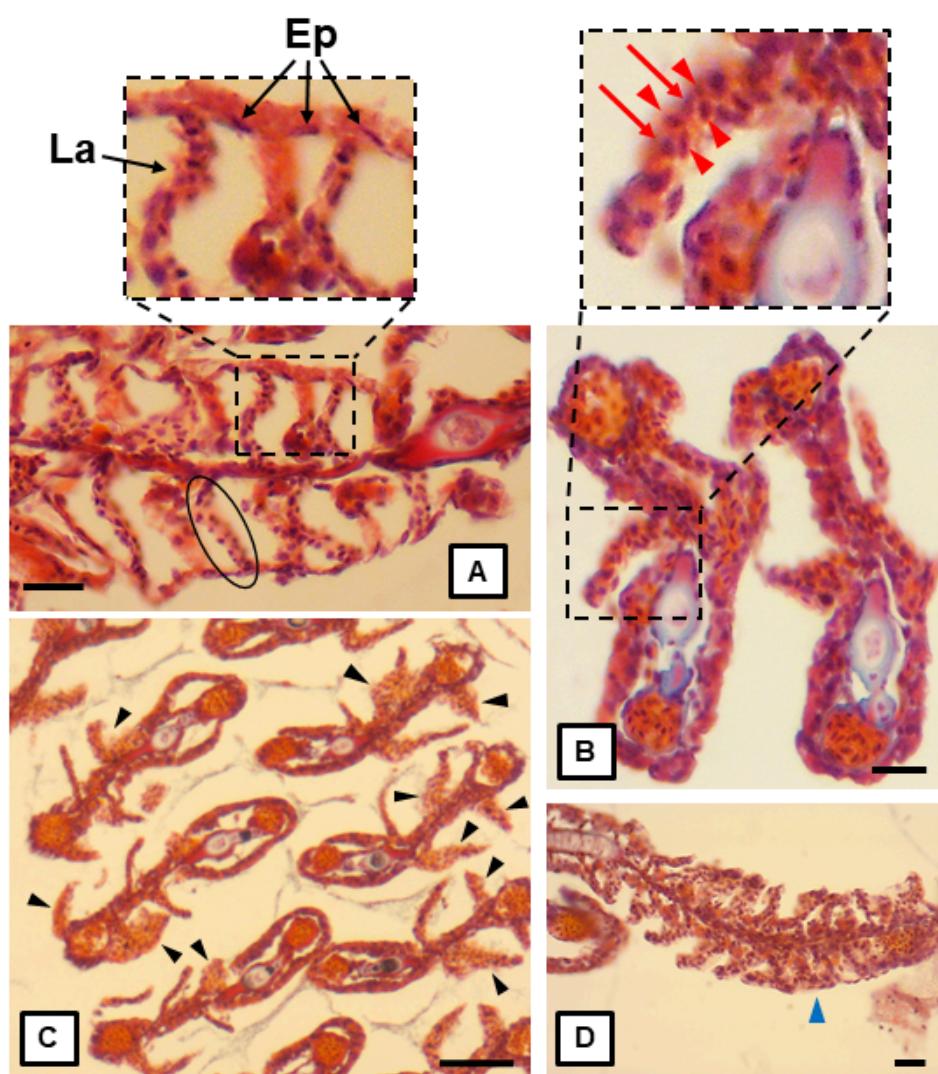


Figura 23. Histopatologías branquiales. A: desprendimiento del epitelio de las lamelas secundarias. Se identifican las lamelas secundarias (óvalo negro, La) sin el epitelio adherido (Ep). B: aumento de la irrigación, evidenciado como una mayor abundancia de eritrocitos (puntas de flecha rojas) en cada laguna sanguínea, separadas por células pilares (flechas rojas). C: aumento exacerbado de la irrigación, donde las células pilares se rompieron y se formaron aneurismas (telangiectasias, puntas de flecha negras). D: fusión de lamelas secundarias (punta de flecha azul) observada solo en el tratamiento de 1000 µg/L de DCF. Barras: A, B, D: 20 µm; C: 50 µm.

En cuanto a las células mucosas detectadas con la coloración Azul Alcian, se observó en todos los tratamientos con DCF un incremento de su cantidad en la región apical de los filamentos primarios, pero no se observó un incremento de estas células en los espacios interlamelares como se puede ver en la Figura 24.

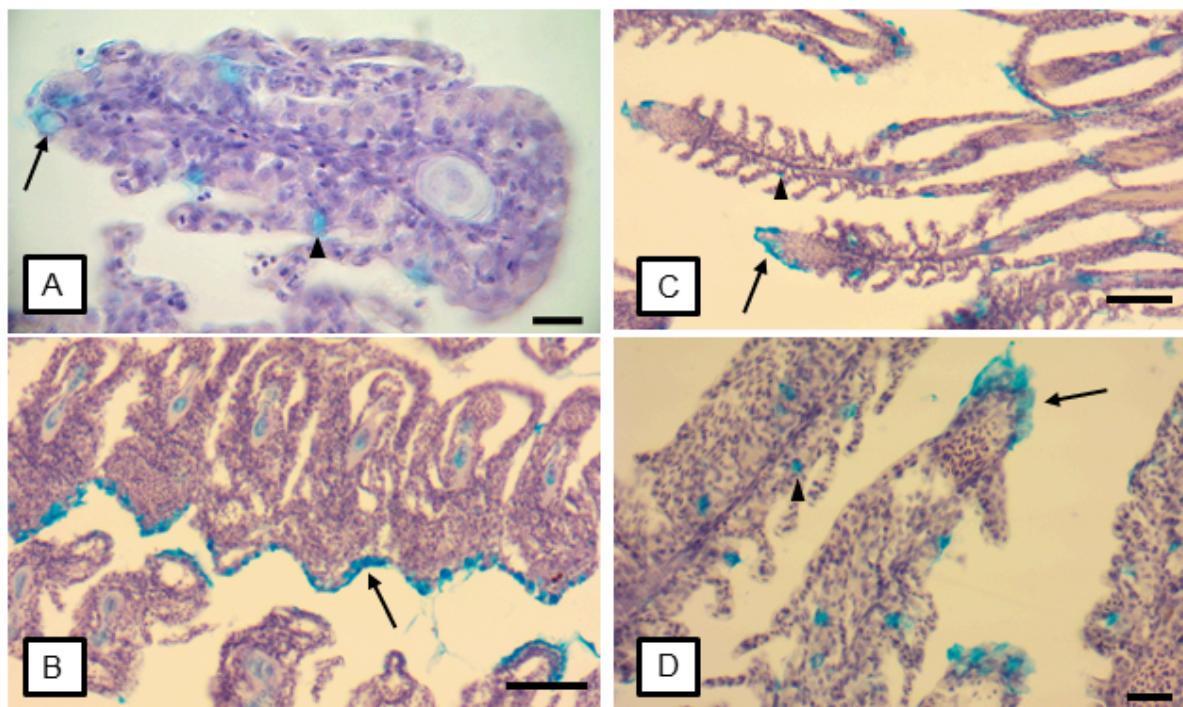


Figura 24. Células mucosas de las branquias. A: filamento branquial de un ejemplar control. Se observan pocas células mucosas en la región apical del filamento primario (flecha) y una célula mucosa en cada espacio interlamelar (punta de flecha). B: filamentos branquiales de un ejemplar expuesto a 10 µg/L de DCF. Se observa un incremento de las células mucosas en la región apical. C: filamentos branquiales de ejemplar expuesto a 100 µg/L de DCF. Se identifica un mayor número de células mucosas en comparación con el control. D: filamentos branquiales de un ejemplar expuesto a 1000 µg/L de DCF. Se cuenta un mayor número de células mucosas en la región apical, pero no en los espacios interlamelares, en comparación con el control. Barras: A, D: 20 µm; B, C: 50 µm.

En la Figura 25 se muestra una imagen topográfica del tronco de un ejemplar control y detalles del hígado. Se identificaron los riñones en posición dorsal, el tubo digestivo con vellosidades, el páncreas endocrino asociado a tejido adiposo y un hígado prominente (Figura 25A) contenido en centros melanomacrofágicos (Figura 25B) y cúmulos de páncreas exocrino asociados a vasos sanguíneos (Figura 25C). Los hepatocitos se observaron con un citoplasma poliédrico que contiene grandes vacuolas translúcidas (reserva de glucógeno). El núcleo se encontró en posición excéntrica, presentando un nucleolo bien prominente (Figura 26A).

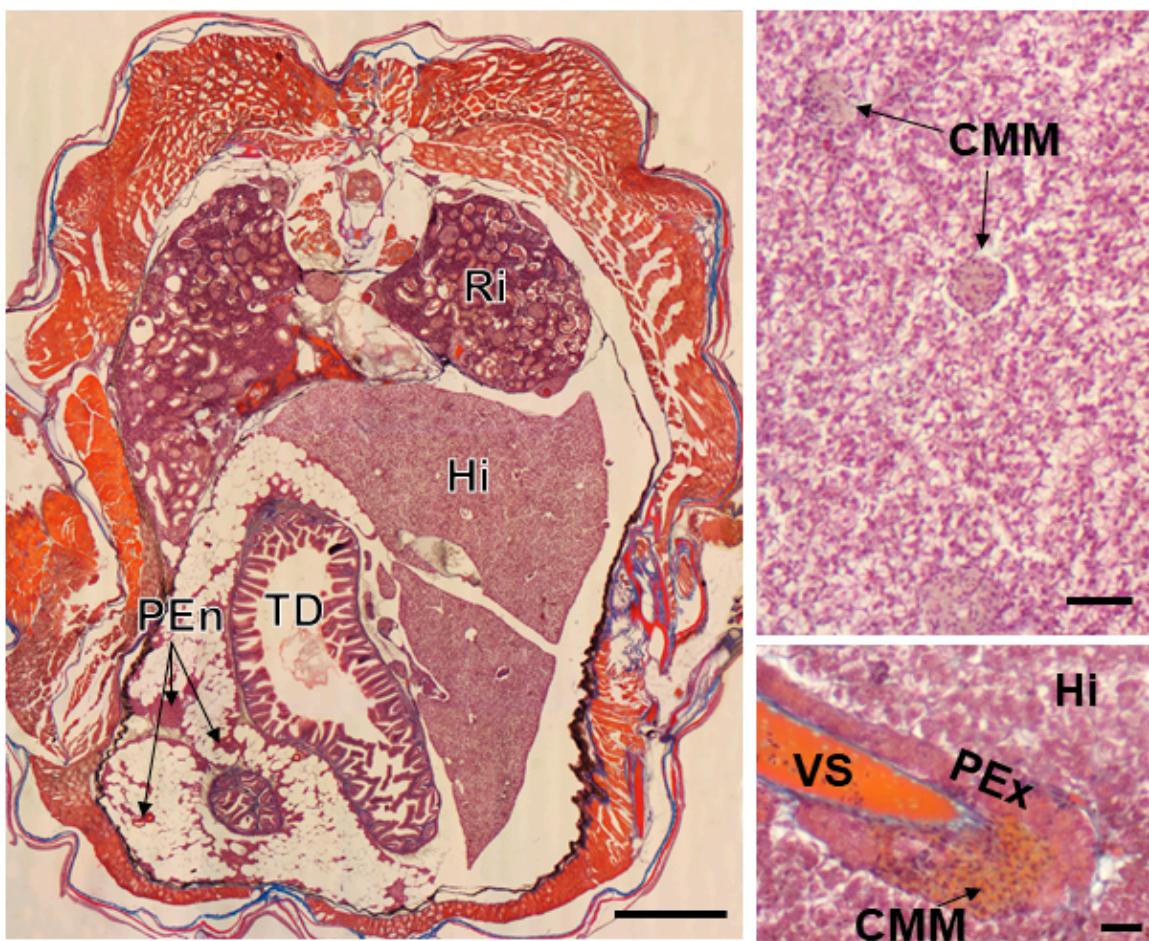


Figura 25. Corte transversal del abdomen y detalle del hígado. A: imagen topográfica del abdomen en corte transversal. B: detalle del hígado. C: sección del hígado con páncreas exocrino. Abreviaturas: centro melanomacrocágico (CMM), hígado (Hi), páncreas endócrino (PEn), páncreas exocrino (PEx), riñón (Ri), tubo digestivo (TD), vaso sanguíneo (VS). Barras: A: 500 μm ; B: 50 μm ; C: 20 μm .

El análisis del hígado mostró una tendencia a mayor congestión de los hepatocitos, observada en términos de un citoplasma perinuclear muy basófilo asociado a una intensa actividad de síntesis proteica, una reducción de las vacuolas conteniendo glucógeno, una mayor basofilia del citoplasma y una mayor incidencia de espacios intercelulares a medida que aumenta la concentración de DCF (Figuras 26 B a D).

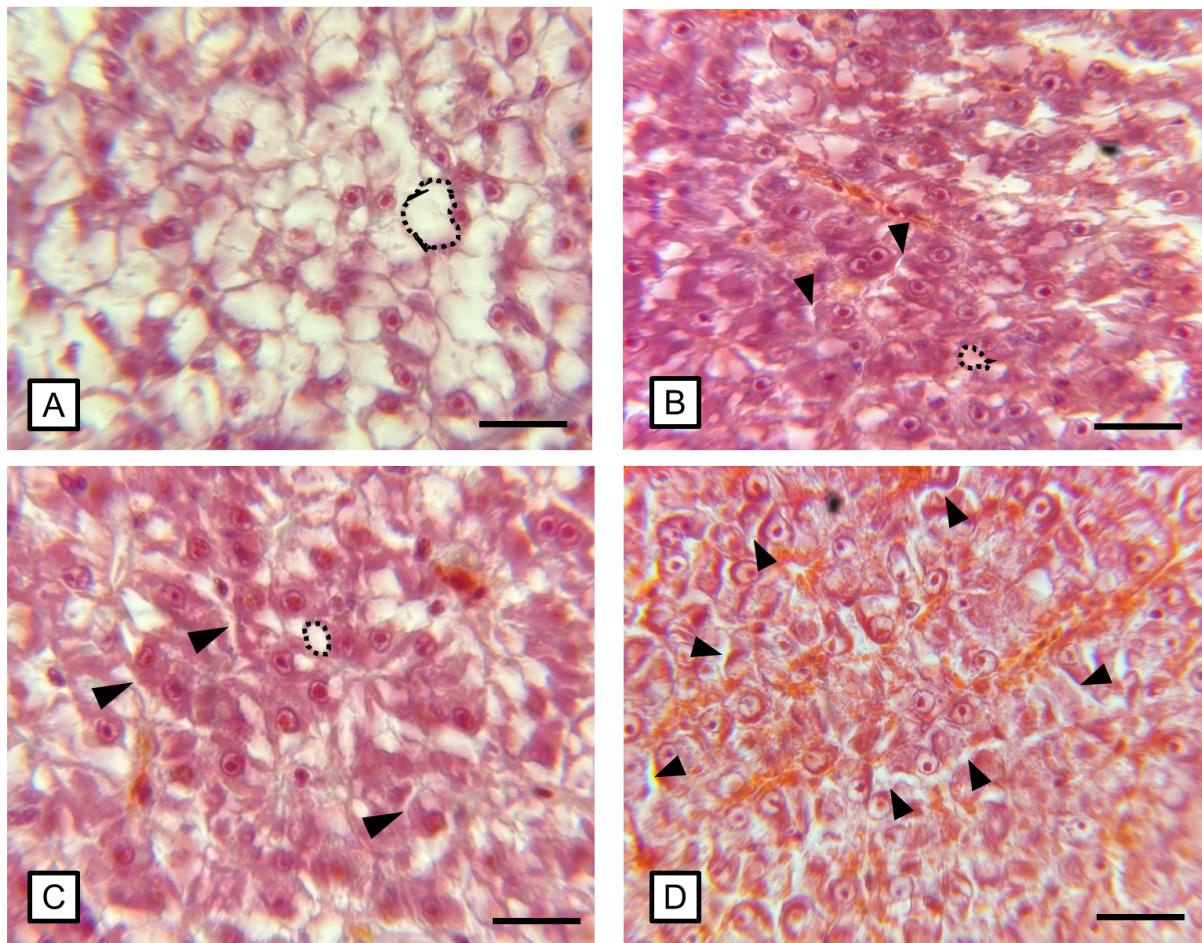


Figura 26. Histopatologías hepáticas. A: corte transversal de hígado de un ejemplar control. Se observan hepatocitos poliédricos con grandes vacuolas conteniendo glucógeno (círculo punteado). B: corte transversal de hígado de un ejemplar expuesto a 10 µg/L de DCF. El tamaño de las vacuolas es menor en comparación al control, aparecen algunos espacios intercelulares (puntas de flecha) y se identifica un citoplasma perinuclear fuertemente basófilo. C: hígado de un ejemplar expuesto a 100 µg/L de DCF. El tamaño de las vacuolas es menor en comparación al control, aparecen aún más espacios intercelulares y se identifica un citoplasma perinuclear fuertemente basófilo. D: hígado de un ejemplar expuesto a 1000 µg/L de DCF. El tamaño de las vacuolas está marcadamente reducido en comparación al control, aparecen abundantes espacios intercelulares y se identifica un citoplasma perinuclear fuertemente basófilo. Barras: A-D: 15 µm.

El examen histológico del ovario no evidenció efectos adversos ocasionados por la exposición al fármaco. Se observó que en la mayoría de los casos el ovario contenía oocitos en diferentes estados de maduración. En las Figuras 27 A y B se muestra un ovario post puesta con folículos post nacimientos y oocitos previtelogénicos o en vitelogenesis temprana, denominado ovario en desarrollo, perteneciente a una hembra expuesta a 10 µg/L de DCF. En las Figuras 27 C y D se observa un ovario con preponderancia de oocitos maduros, en el que también se identifican oocitos previtelogénicos (hembra control). En las Figuras 27 E a G se muestra un ovario de una hembra grávida control, donde coexisten embriones en un estado avanzado del desarrollo con oocitos en crecimiento (previtelogénicos y vitelogénicos).

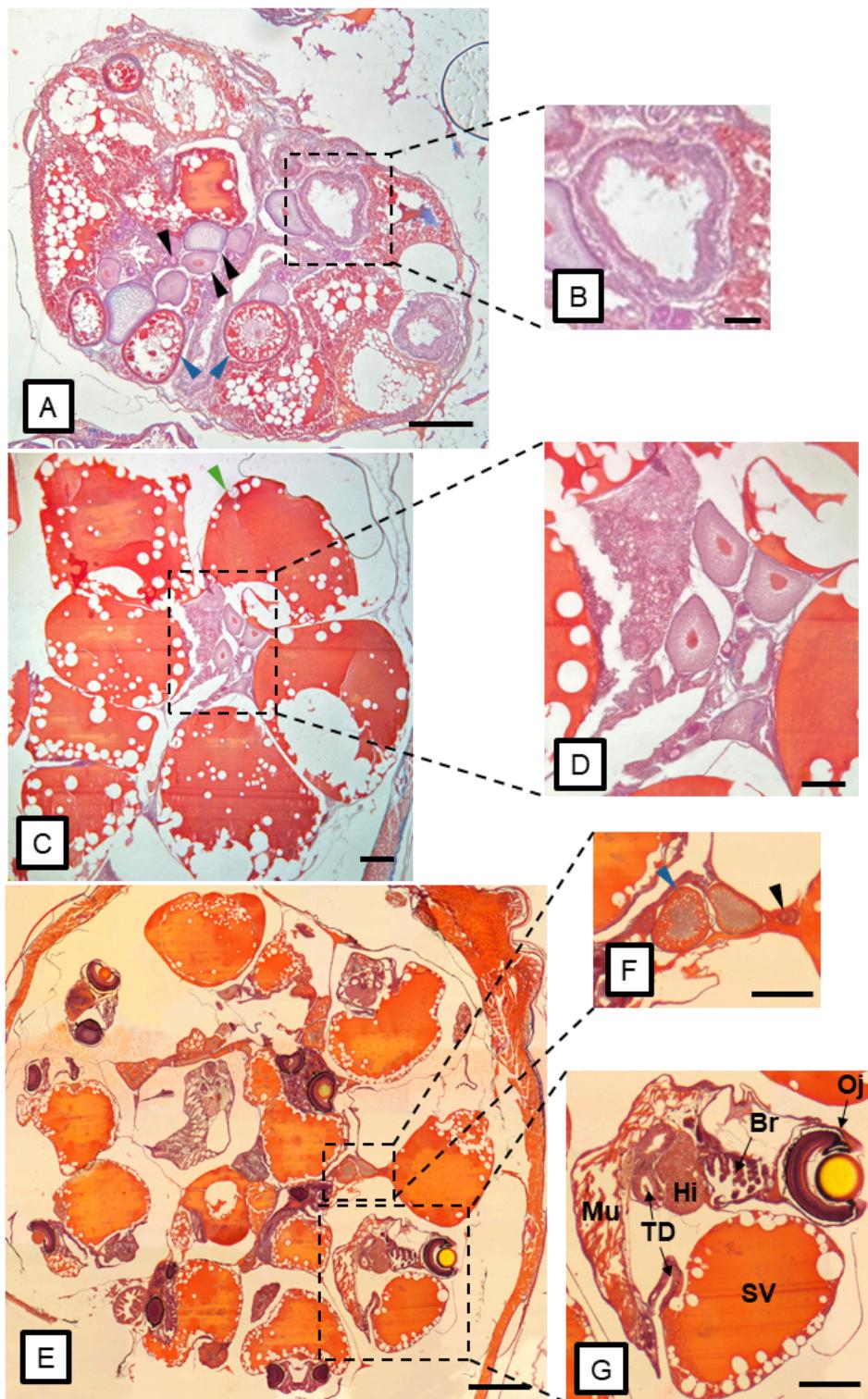


Figura 27. Histología del ovario. A: corte transversal de ovario en desarrollo. Se identifican oocitos previtelogénicos en diferentes estadios (puntas de flecha negras), oocitos vitelogénicos (puntas de flecha azules) y folículos post puesta. B: detalle de un folículo post puesta. C: corte transversal de ovario maduro. Se observa mayoría de oocitos maduros (punta de flecha verde) y algunos oocitos previtelogénicos. D: detalle de oocitos previtelogénicos en diferentes estadios. E: corte transversal de ovario grávido. Se observan numerosos embriones y algunos oocitos en diferentes etapas de desarrollo. F: detalle de oocitos previtelogénicos (punta de flecha negra) y vitelogénicos (punta de flecha azul). G: detalle de embrión en desarrollo. Abreviaturas: branquias (Br), hígado (Hi), músculo (Mu), ojo (Oj), saco vitelino (SV), tubo digestivo (TD). Barras: A, C, F, G: 200 µm; B: 50 µm; D: 100 µm; E: 500 µm.

Parámetros reproductivos

El estado de maduración del ovario al término del ensayo, determinado mediante análisis histológico, así como el porcentaje de hembras que tuvieron al menos una puesta, se muestran en la Tabla 7. Se puede observar una tendencia a una menor proporción de hembras que tuvieron al menos una puesta cuanto mayor es la concentración de DCF, si bien no se detectaron diferencias significativas (Fisher, Control-100 $\mu\text{g/L}$: $p=0,0833$; Control-1000 $\mu\text{g/L}$: $p=0,2619$). De las hembras que presentaron puestas, solo una tuvo dos camadas; este ejemplar correspondió al tratamiento con 10 $\mu\text{g/L}$ de DCF.

Tabla 7. Parámetros reproductivos. Número de individuos con el ovario en desarrollo, maduro o grávido, según lo observado en cortes histológicos, y porcentaje de individuos que tuvieron puestas al menos una vez, calculados sobre el N inicial. El N del tratamiento de 1000 $\mu\text{g/L}$ no coincide con el N final porque uno de los ejemplares murió el día anterior a la finalización del ensayo e igualmente se procesó para el análisis histológico.

[DCF] ($\mu\text{g/L}$)	Ovario			Puestas (%)
	En desarrollo	Maduro	Grávido	
0	-	4	1	60
10	2	2	-	60
100	-	4	1	0
1000	-	1	2	20

La cantidad de crías por puesta resultó ser muy variable dentro de los tratamientos, de modo que en el control se registraron camadas de 1 a 26 crías y en los individuos expuestos a 10 $\mu\text{g/L}$ de DCF hubo camadas de 4 a 26 crías. En el tratamiento de 1000 $\mu\text{g/L}$ de DCF se registró una sola puesta con 10 crías.

Morfología externa de juveniles

La observación bajo lupa de los juveniles fijados reveló diferencias entre el grupo control y la segunda camada de la hembra expuesta a 10 $\mu\text{g/L}$ de DCF (10 semanas de exposición). Las crías nacidas bajo exposición al DCF presentaron malformaciones como ser el abdomen abultado, a diferencia de las nacidas en agua libre de fármaco (Figura 28). Además, se encontró una diferencia significativa en el Lst de los ejemplares (T-test, $p<0,0001$). Mientras que en el grupo control las crías eran de 6,91 mm de Lst (EE: 0,082 mm), la segunda camada de la hembra expuesta a 10 $\mu\text{g/L}$ de DCF presentaron un Lst de 6,44

mm (EE: 0,051 mm). Cabe destacar que tanto en las primeras puestas de los grupos tratados como en el control no se observó ninguna malformación.

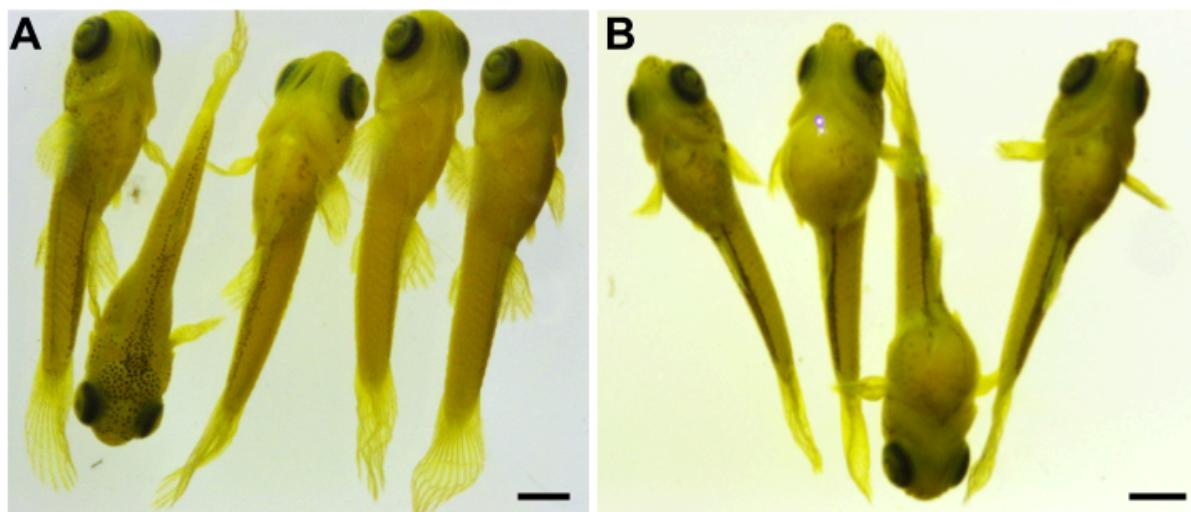


Figura 28. Morfología externa de los juveniles. A. Se observan ejemplares en vista dorsal y ventral, pertenecientes al tratamiento control. B. Vista ventral de juveniles de la segunda camada de la hembra expuesta a 10 µg/L de DCF (10 semanas de exposición). Estos juveniles presentan malformaciones como ser abdomen abultado y menor largo estándar respecto del control. Barras: 1 mm.

Discusión

Daphnia magna

Parámetros reproductivos

La exposición subcrónica de *D. magna* a 10, 100 y 1000 µg/L de DCF no afectó el tiempo hasta la primera camada. En consonancia con estos resultados, Lee y col. (2011) realizaron bioensayos de 21 días de exposición, en esta misma especie, a concentraciones que van desde 900 µg/L a 25 mg/L de DCF y en ninguno de los tratamientos encontraron diferencias significativas en el día de la primera camada con respecto al control. Por otro lado, en un trabajo de Liu y col. (2017) se informó un atraso del día de la primera camada luego de una exposición de 21 días a 50 µg/L de DCF, pero este efecto no se vio a 5 ni a 500 µg/L. Los autores hipotetizan que podría estar ocurriendo una regulación negativa del gen de la vitelogenina (Vtg) ante una exposición de 21 días a 50 µg/L de DCF. En otro estudio se ensayaron las concentraciones de 2 y 10 µg/L de DCF y fue en este último tratamiento donde se observó un aumento significativo del tiempo hasta la primera camada (Nkoom y col., 2022). Los autores de este último trabajo resaltan que sus resultados son inconsistentes con trabajos previos, como el de Liu y col. (2017); también mencionan que este fármaco no tiene un efecto tan fuerte como otros (carbamazepina) sobre los parámetros reproductivos evaluados y que los efectos adversos se acentúan cuando la exposición es transgeneracional (observando diferencias en el tiempo hasta la primera camada en la filial 1). Este resultado es importante a tener en cuenta cuando se realizan evaluaciones de riesgo porque en el ambiente la exposición se extiende en el tiempo, siendo transgeneracional.

En cuanto a la cantidad de camadas por hembra, la exposición a las tres concentraciones de DCF ensayadas no ocasionó alteraciones respecto al control. Consistentemente, Liu y col. (2017) tampoco encontraron diferencias significativas en un intervalo de 5 a 5000 µg/L de DCF, en comparación con el control. Además, los valores que obtuvieron coinciden con la cantidad de camadas informadas en el presente estudio (tercer bioensayo, 21 días de exposición, entre 4 y 5 camadas por hembra). Sin embargo, Du y col. (2016) sí hallaron una disminución significativa de la cantidad de camadas respecto al control para las concentraciones de 500 y 1500 µg/L.

Es destacable que el intervalo entre camadas no se suele analizar en los ensayos toxicológicos con *D. magna*. En este trabajo se evaluó esta variable y no se observaron diferencias entre los organismos expuestos al fármaco y el control.

Respecto de los análisis de la cantidad de crías, no existe un consenso en la manera de informar los resultados, de modo que en la bibliografía se encuentra tanto el número acumulado de crías por hembra como el promedio de crías por camada. Respecto del número acumulado de crías, a los 16 días del tercer bioensayo no se observó una cantidad significativamente menor de neonatos respecto al control en los tratamientos con DCF. Asimismo, en el trabajo de Lee y col. (2011) no se encontraron diferencias significativas en el acumulado de crías incluso a una concentración de 8,3 mg/L de DCF, aunque sí se observa una tendencia a la disminución de este valor. Por otro lado, Nkoom y col. (2022) reportaron una disminución significativa del 36% del número acumulado de crías en bioensayos con 2 y 10 µg/L de DCF. Los autores sugieren que el DCF podría haber actuado sobre la división celular, inhibiendo la capacidad reproductiva de los organismos y aumentando el número de embriones abortados.

En los trabajos que informan el promedio de crías por camada los resultados también son variables. Mientras que en un estudio no hallaron diferencias en el promedio de crías en un intervalo entre 5 a 5000 µg/L del fármaco (Liu y col., 2017) y en un segundo estudio tampoco observaron este efecto incluso hasta 8,3 mg/L de DCF (Lee y col., 2011), Du y col. (2016) reportaron una disminución significativa de esta variable a concentraciones de 500 y 1500 µg/L. En el presente trabajo de tesis, el tercer bioensayo mostró diferencias significativas en el promedio de crías por camada respecto al control al día 16 de exposición, en todas las concentraciones ensayadas. En efecto, todos los grupos expuestos a DCF mostraron una disminución significativa del promedio de crías. Sin embargo, a los 21 días de exposición el promedio de crías se asemejó al control. Esto podría sugerir que hay una ventana de sensibilidad al fármaco en alguna instancia entre la madurez reproductiva y los 16 días de vida, que luego se enmascara debido al posterior desarrollo de los parentales hasta el día 21.

Es importante destacar que la concentración más baja ensayada (10 µg/L) se incluye dentro del intervalo de concentraciones ecológicamente relevantes detectadas en el ambiente acuático. Por lo tanto, las alteraciones observadas en este tratamiento presentan especial relevancia desde el punto de vista ecotoxicológico.

Parámetros morfométricos

Con respecto a la longitud del cuerpo de los parentales luego de los 21 días de exposición, los resultados del bioensayo (Figura 18) coinciden con lo reportado en bibliografía, esto es que no se encuentran diferencias significativas en el largo del cuerpo entre controles y tratados (Liu y col., 2017; Nkoom y col., 2022). Hanazato (1998) le otorga importancia a la evaluación de este parámetro a la hora de estudiar los efectos tóxicos sobre la reproducción de *D. magna*, dado que el tamaño de los parentales, así como la tasa de crecimiento, influyen fuertemente sobre la cantidad de crías que pueden tener. De esta forma, se esperaría que parentales de menor tamaño tengan una progenie menos numerosa. En el presente trabajo, considerando solamente los resultados de longitud del cuerpo, se observó una coherencia con los resultados acerca de la cantidad de crías: no se observaron diferencias significativas con el control a los 21 días.

Existe la posibilidad de que el DCF afecte el potencial reproductivo de los parentales hacia los 16 días de vida sin influenciar la tasa de crecimiento. En este caso, el DCF podría estar actuando como un agente estresante que conduciría a una distribución desigual de la energía disponible. De esta forma, se mantendría la inversión energética en el crecimiento somático (por lo que no se ven diferencias en el largo del cuerpo al final del ensayo), disminuyendo la correspondiente al proceso de reproducción. Esta hipótesis es coherente con los resultados obtenidos por Nkoom y col. (2019), que observaron una disminución en la tasa de filtración e ingesta de *D. magna* expuesta a 5, 15, 50 y 100 µg/L de DCF, vinculando este resultado con la menor cantidad de crías.

Calidad de la progenie

El análisis de la calidad de la progenie develó efectos sobre la mortalidad y malformaciones en los neonatos a los 16 días de exposición a DCF. En este sentido, se observó un incremento de la mortalidad de los neonatos en el segundo bioensayo, a la concentración de 1000 µg/L. En cuanto al tipo de malformaciones registradas, en el segundo ensayo la curvatura de la espina caudal resultó significativamente mayor que en el control en los tratamientos de 10 y 1000 µg/L de DCF, mostrando una tendencia similar en el tercer bioensayo. Además, en ambos ensayos se registró la atrofia del ojo y el arresto del desarrollo en los tratamientos con DCF, pero no en el control. En conjunto, estos resultados sugieren que existe un efecto del fármaco sobre la calidad de la progenie, aún cuando su incidencia no fuera elevada. Es importante destacar que tanto la curvatura de la espina caudal como la

atrofia del ojo y el arresto del desarrollo se evidenciaron en la concentración ambientalmente relevante (10 µg/L).

Respecto de la atrofia de las antenas y a la dificultad motriz, no se encontraron diferencias significativas ni tendencias a concentraciones crecientes de DCF. Además, se observó que su proporción disminuyó entre el segundo y el tercer bioensayo. Esto podría deberse a una de las modificaciones realizadas en el diseño experimental, según se desarrolla más adelante.

Al analizar los resultados hasta el día 21 de exposición, no se encontraron diferencias significativas ni tendencias a su aparición en concentraciones crecientes de DCF, en cuanto a la incidencia de malformaciones. Este resultado se condice con una posible ventana de susceptibilidad que aparecería antes de los 16 días de exposición, según se comentó previamente, pero que quedaría enmascarada con el crecimiento posterior de los parentales.

La curvatura de la espina caudal podría deberse a alteraciones en la vía metabólica de la quitina. El exoesqueleto de *D. magna* está conformado por α-quitina y otras proteínas que constituyen la fase orgánica, así como carbonato de calcio y fosfatos como componentes inorgánicos (Ritschar y col., 2020). La síntesis de quitina depende de la ecdisona, y es necesaria la deposición de este compuesto y de otras glicoproteínas sobre la fase orgánica para que se calcifique el exoesqueleto. Un estudio hecho con crustáceos del género *Gammarus* expuestos a aguas contaminadas develó una disminución significativa de quitina en sus exoesqueletos, sugiriendo una interrupción en el proceso de formación de este polisacárido mediado por ecdisona (Gagné y col., 2005). Además, en otros estudios realizados en *Daphnia* sp., se ha sugerido que la testosterona podría actuar como un antagonista del receptor de ecdisona o bien como un inhibidor de la síntesis deecdisteroides, produciendo malformaciones como las que se observaron en este trabajo (atrofia de antenas, espina caudal curvada y arresto del desarrollo) y reduciendo además el crecimiento, la longevidad y la fecundidad (LeBlanc y col., 2000). Liu y col. (2017) sugieren que el DCF podría afectar diversas enzimas involucradas en la síntesis o en la vía de ecdisona. Estos resultados en conjunto apuntan a que el DCF podría estar actuando como un desorganizador endocrino capaz de alterar algún paso de la vía de ecdisona, modificando indirectamente la composición y resistencia del exoesqueleto, e incluso conduciendo al arresto del desarrollo.

Por otra parte, se ha afirmado que la exposición a compuestos tóxicos conduce a un estado de estrés que genera un desbalance en el metabolismo energético de los crustáceos (Sokolova y col., 2012). Ya sea por una menor tasa de captación de energía a través de la ingesta o por una mayor derivación de la energía hacia las vías detoxificantes, el estrés

generado por el ambiente puede llevar a una menor cantidad de energía disponible para la reproducción, el desarrollo y el crecimiento de estos animales (Weis, 2015; Zanitti y col., 2023; Rodríguez, 2024). El impacto del DCF sobre el potencial reproductivo, evidenciado en este trabajo como una reducción en la cantidad de crías y una mayor incidencia de mortalidad y malformaciones de los neonatos, podría corresponderse, al menos en parte, con la hipótesis de un desbalance energético, catalogando al DCF como un agente estresor en la especie *D. magna*.

Diseño experimental

Acerca de la puesta a punto del diseño experimental resulta importante destacar algunos aspectos a tener en cuenta para futuros ensayos:

- El protocolo establecido por la OECD (2012) no especifica el origen de los organismos que ingresan al ensayo, es decir, si provienen de un único parental o de varios. Asimismo, la bibliografía consultada tampoco hace referencia a la procedencia de los organismos. De esta manera, si las hembras del ensayo provienen de uno o más parentales resulta una variable a determinar por el experimentador. En este trabajo se realizaron ensayos con hembras provenientes de un único progenitor (primer bioensayo) y con hembras provenientes de varios (segundo y tercer bioensayo), obteniendo ventajas y desventajas en cada caso. Trabajar con un solo progenitor produce menos variabilidad dado que los animales que ingresan al ensayo son clones, pero eso es menos representativo de la población porque cada organismo presenta diferentes grados de susceptibilidad. Por otro lado, trabajar con organismos provenientes de varios parentales permite hacer un ensayo más representativo, pero también aporta más variabilidad en los resultados y eso podría enmascarar un efecto del compuesto a evaluar. Teniendo en cuenta estos aspectos, si se desea realizar un ensayo ecotoxicológico, es preferible utilizar la mayor cantidad posible de parentales provenientes de diferentes cultivos, representando así la variabilidad natural de las poblaciones de esta especie.
- La temperatura tiene un fuerte efecto sobre la cantidad de crías por camada. En observaciones realizadas en el laboratorio durante los meses de invierno (promedio de 15°C) se registraron valores de hasta 60 neonatos por camada. En cambio, en verano (promedio de 25°C) se registraron valores de 5 neonatos como máximo por camada. Por lo tanto, la temperatura resulta un fuerte determinante en la cantidad de crías y es importante respetar el rango establecido como óptimo por la OECD, entre 18 y 22°C.

- *D. magna* posee un exoesqueleto muy frágil y el daño mecánico puede conducir a la muerte o a falsas malformaciones. Por lo tanto, es fundamental cerciorarse de que los elementos utilizados para la manipulación de los animales no ocasionen un daño mecánico, por más mínimo que sea. En este sentido, en el presente trabajo se aumentó el tamaño de la punta de las pipetas para el tercer bioensayo y esto condujo a una menor mortalidad de los parentales. Además, se registró una menor incidencia de la atrofia de las antenas y la dificultad motriz de los neonatos, sugiriendo que lo que antes se había registrado como tal posiblemente fuera producto del daño mecánico ocasionado por las pipetas más pequeñas.

Poecilia reticulata

Parámetros morfométricos y mortalidad

Los parámetros morfométricos evaluados luego de una exposición subletal subcrónica de *P. reticulata* a 10, 100 y 1000 µg/L de DCF no mostraron diferencias significativas. En particular, el factor de condición fue superior a 2 en todos los casos, indicando que los peces se encontraban en buenas condiciones fisiológicas y nutricionales (Gupta y col., 2011; Lawal, 2020). Sin embargo, a la concentración más alta de DCF se observó una tendencia a mayor tasa de mortalidad. En consonancia con estos resultados, otros estudios toxicológicos realizados en esta especie tampoco encontraron un efecto de otros contaminantes sobre el factor de condición (estrógenos, Tian y col., 2018; benzofenona-3, dos Santos Almeida y col., 2019; trifenilestaño, Zhang y col., 2019; 2,2'-ditiobis-piridina, Li y col., 2022), a pesar de que tales contaminantes sí causaron efectos adversos. Teniendo en cuenta estos reportes y los resultados obtenidos en el presente trabajo, se evidencia que la relación largo-peso no necesariamente se ve afectada por compuestos tóxicos cuando los bioensayos se realizan en estos tiempos de ensayo sobre ejemplares adultos.

Efectos sobre el comportamiento

Los comportamientos exacerbados que fueron observados (saltos hacia fuera de la pecera, hiperexcitación, nado rápido, agitación, etc.) se registraron principalmente en el tratamiento de 1000 µg/L de DCF, seguido del tratamiento de 10 µg/L, mientras que en el control no se observó ninguno de estos comportamientos. Sandström (2022) propuso un

potencial efecto neurotóxico de este fármaco sobre varias especies, entre las que se incluyen los peces. Se han reportado tanto un incremento como una disminución de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en crustáceos, anfibios y peces a diferentes concentraciones de DCF. La AChE suele ser utilizada como biomarcador de neurotoxicidad, por jugar un papel importante en las placas neuromusculares hidrolizando la ACh, que a su vez afecta las actividades cognitivas y el movimiento espontáneo. Existe la posibilidad de que los comportamientos registrados en este trabajo se deban a una disminución de la actividad de AChE, ocasionando cierta hiperactivación del sistema neuromuscular. Otros efectos sobre peces bajo exposición a DCF incluyen nado errático, pérdida del equilibrio, posicionamiento en el fondo sin moverse, deglución de aire y estrés respiratorio (Ajima y col., 2015). Sería de interés poder determinar la actividad de esta enzima tanto en muestras de músculo como de encéfalo para corroborar este efecto.

Otra explicación posible para los efectos comportamentales registrados es que los peces se encontraran en condiciones de hipoxia. Domenici y col. (2012) plantearon que las condiciones de hipoxia llevarían a cambios en la actividad natatoria, incrementándola en especies activas como lo es *P. reticulata*. Además, en su trabajo mencionan que los peces tienen la capacidad de evadir la hipoxia buscando áreas mejor oxigenadas, lo que podría ser una explicación para los saltos registrados en el presente trabajo. Por su parte, Mandic y col. (2009) observaron agitación e intentos de escape en peces de la familia Cottidae bajo condiciones de hipoxia. Teniendo en cuenta los efectos histopatológicos registrados en las branquias de los ejemplares expuestos de *P. reticulata*, podría pensarse que los comportamientos observados se deben a condiciones de hipoxia histotóxica.

Histopatología de órganos

El análisis histopatológico de las branquias y el hígado de las hembras de *P. reticulata* expuestas a DCF reveló alteraciones adversas sobre estos órganos, incluso a la concentración ambientalmente relevante. Los efectos en branquias incluyeron desprendimiento del epitelio, mayor irrigación, telangiectasias y aumento del número de células mucosas, a todas las concentraciones ensayadas. Además, en la concentración más alta se identificó fusión de las lamelas secundarias. Estas alteraciones se han reportado también en otras especies (*O. mykiss*, *Oreochromis niloticus* y *S. trutta*) luego de exposiciones subcrónicas a DCF, en un intervalo de concentraciones desde 0,1 a 500 µg/L (Schwaiger y col., 2004; Triebeskorn y col., 2004; Hoeger y col., 2005; Groner y col., 2017) y también en *Cyprinus carpio* expuesto a concentraciones más elevadas (de 1,25 a 5 mg/L; Mohebbi Derakhsh y col., 2020).

Mohebbi Derakhsh y col. (2020) discutieron posibles explicaciones de los cambios fisiológicos que se observan en las branquias frente a la exposición a compuestos tóxicos en el ambiente. Las branquias constituyen una estructura que aproxima la sangre al ambiente con un fino tejido epitelial de por medio que permite el intercambio de gases, iones y desechos nitrogenados, pero que a su vez hace vulnerable al organismo frente a la posible presencia de contaminantes en el agua. Algunas de las alteraciones observadas, como el desprendimiento del epitelio y la fusión de lamelas, se podrían interpretar como mecanismos de defensa que aumentan la distancia entre la sangre y el exterior. El desprendimiento del epitelio suele generarse por edema de las lamelas secundarias, mientras que la fusión de las lamelas y la hiperplasia del epitelio (no observado en este trabajo) podrían deberse a un incremento de las divisiones mitóticas desencadenado por la presencia del fármaco. Por otro lado, las alteraciones tales como dilatación de los capilares, acumulación de eritrocitos en las lagunas sanguíneas y telangiectasias se producen por la ruptura de las células pilares, incrementando el flujo de sangre por las lamelas. Otro mecanismo de defensa consiste en el aumento de secreción de mucus, que funciona como una barrera frente a los compuestos tóxicos. Esto se correlaciona con el aumento del número de células mucosas observado en este y otros trabajos (Kantham & Richards, 1995). Hoeger y col. (2005) sugieren que las prostaglandinas (PGs) podrían estar jugando un papel importante en la regulación de la circulación sanguínea y el intercambio de iones en las branquias de los peces, tal como lo hacen en los riñones de los mamíferos. De ser así, sería esperable que los efectos adversos observados en este órgano se relacionen con la acción del DCF, que al igual que otros AINEs, inhibe las ciclooxygenasas que catalizan la síntesis de PGs.

En cuanto al hígado, los efectos observados consistieron en una mayor congestión de los hepatocitos, la reducción de las vacuolas conteniendo glucógeno, una mayor basofilia del citoplasma y mayor incidencia de espacios intercelulares. Si bien el análisis de estas patologías se realizó de forma cualitativa, se halló una tendencia a la acentuación de estos efectos a mayor concentración de DCF. La congestión de los hepatocitos, observada como un citoplasma perinuclear fuertemente basófilo, se relaciona con una mayor actividad de síntesis proteica. Este efecto va acompañado por los cambios en el citoplasma, donde se evidenció una transición hacia mayor basofilia a mayores concentraciones de DCF, asociada a un aumento del contenido proteico y a una reducción del tamaño de las vacuolas conteniendo glucógeno. Estas alteraciones se han reportado también en otras especies (*O. mykiss* y *S. trutta*) luego de exposiciones subcrónicas a DCF en un intervalo de concentraciones desde 0,1 a 500 µg/L (Triebskorn y col., 2004; Hoeger y col., 2005; Schwarz y col., 2017).

Triebskorn y col. (2004) interpretaron estos efectos como signos de un estado de estrés que conduce a movilizar las reservas de energía y modificar la estructura de las organelas frente a la necesidad de intensificar la capacidad detoxificante. Según estos autores, este tipo de respuesta celular suele observarse frente a factores de estrés externos, tales como el DCF u otros xenobióticos presentes en el agua. En este sentido, el hígado podría ser uno de los principales tejidos afectados, ya que juega un papel predominante en el metabolismo del primer paso, funcionando como un filtro previo a que las sustancias (ingresadas por vía oral) accedan a la circulación sistémica. Correspondientemente, Schwaiger y col. (2004) analizaron la concentración de DCF en distintos órganos de *O. mykiss* luego de una exposición subcrónica a concentraciones entre 1 y 500 µg/L y hallaron que la concentración más alta se encontraba en el hígado, con un factor de bioconcentración de hasta 2732.

En cuanto a los espacios entre hepatocitos, el incremento en la incidencia de esta patología ha sido reportada en *S. trutta* luego de una exposición subcrónica a 100 µg/L de DCF (Schwarz y col., 2017). Este efecto podría estar relacionado con la disminución de las reservas de glucógeno, que otorgan turgencia a la célula, conduciendo a que los hepatocitos adquieran formas irregulares y a que se generen espacios extracelulares.

La dilatación de los sinusoides y la presencia de agregados melanomacrofágicos fueron descriptos en bioensayos previos como patologías ocasionadas por el DCF (Hoeger y col., 2005; Mohebbi Derakhsh y col., 2020). Sin embargo, en este trabajo ambos fenómenos fueron observados tanto en los organismos expuestos como en el control. La variación registrada en la abundancia y nivel de dilatación de los vasos sinusoides probablemente se deba a la altura a la que se realizaron los cortes, habiendo regiones del hígado más vascularizadas que otras. Por otro lado, los centros melanomacrofágicos se encuentran normalmente en hígado y páncreas exocrino con función inmune y no parecieron incrementarse por la exposición al fármaco.

En lo que respecta al ovario, algunas histopatologías frecuentemente reportadas en la bibliografía incluyen un mayor número de oocitos atrésicos, acumulación de células pigmentadas y fibrosis (Blazer, 2002). Ninguno de estos efectos fue observado en los cortes histológicos de los organismos expuestos en los tiempos ensayados.

Parámetros reproductivos

Con el fin de analizar el efecto del DCF sobre los parámetros reproductivos de *P. reticulata*, resulta importante revisar el papel que juegan las PGs sobre la reproducción en los peces ovovivíparos. Las PGs están fuertemente relacionadas con la ovulación en los peces

teleósteos. Venkatesh y col. (1992) realizaron una cuantificación de los niveles de PGs sintetizadas por los folículos ováricos durante su desarrollo, en *P. reticulata*. Lo que hallaron fue que los folículos sintetizan una baja cantidad de PGs durante el crecimiento y la maduración de los oocitos, y durante la gestación temprana del embrión. Sin embargo, la síntesis de esta hormona aumenta significativamente en la gestación media y tardía, seguida de una marcada disminución en los folículos post-eclosión. En relación a esto, los autores realizaron una comparación entre la variación temporal de los niveles de PGs en peces ovíparos y ovovivíparos. En los primeros, la ovulación ocurre inmediatamente después de la maduración de los oocitos y se ha registrado que los folículos sintetizan grandes cantidades de PGs durante la maduración y ovulación. Por el contrario, en *P. reticulata* no se produce la ovulación una vez que los oocitos maduran, sino que estos son retenidos en la pared del ovario y, si hay fecundación, las crías se liberan recién al final de la gestación. En este caso, los folículos sintetizan grandes cantidades de PGs recién durante la gestación media y tardía. Lo que sugieren los autores es que esta síntesis tardía de PGs durante el ciclo reproductivo facilitaría el desarrollo intrafolicular de *P. reticulata*, demorando el evento de ruptura del folículo.

Teniendo en cuenta el análisis realizado por Venkatesh y col. (1992), sería esperable que en los peces ovovivíparos las PGs actúen para estimular la eclosión, pero no sobre la maduración de los folículos. Además, en los organismos expuestos a DCF sería esperable encontrar efectos relacionados con una menor síntesis de PGs. Estas hipótesis se condicen con los resultados obtenidos en este trabajo. Por un lado, en los análisis histológicos del ovario no se observó un impacto negativo del DCF sobre la maduración de los oocitos, dado que se encontraron folículos en distintos grados de maduración, con gran preponderancia de oocitos maduros y sin una mayor incidencia de oocitos atrésicos en los individuos expuestos. Por otro lado, se observó una tendencia a una menor proporción de hembras que tuvieron al menos una puesta en los tratamientos de 100 y 1000 µg/L de DCF. Si efectivamente las PGs son necesarias para la eclosión, el DCF podría estar interfiriendo en este mecanismo mediante la inhibición de las COX, de modo que los niveles de PGs no alcancen para liberar a las crías hacia el oviducto y producir la puesta.

Si bien en la concentración ambientalmente relevante de DCF ensayada no se observó la tendencia a un menor porcentaje de hembras que tuvieron puestas, sí se registraron anomalías en la morfología externa de los juveniles post puesta pertenecientes a la segunda camada. La exposición al fármaco durante la gestación completa de esta camada comprendió diversos efectos como la presencia de un abdomen abultado, posiblemente conteniendo aún

reservas de vitelo, y menores tallas corporales. Estos efectos del DCF sobre *P. reticulata* no han sido previamente reportados. Rifkana y col., (2019) observaron malformaciones en esta especie tales como la columna vertebral curvada y aletas con alteraciones óseas luego de la exposición subcrónica de los juveniles a 1, 10 y 100 µg/L de DCF. Sin embargo, en el presente trabajo la exposición no se realizó directamente sobre los juveniles, sino a través de la vía parental.

Los resultados sobre el tamaño de los juveniles son coherentes con la idea, ya discutida en el caso de *D. magna*, de un desbalance en la cantidad de energía derivada a cada proceso fisiológico. Marchand y col. (2004) trabajaron sobre este fenómeno utilizando peces como modelo de estudio y mencionaron que los mecanismos de protección y/o desintoxicación como posibles respuestas a los contaminantes podrían implicar costos energéticos y, por lo tanto, reducir la energía disponible para otras funciones (reproducción, crecimiento, acumulación de energía en los músculos). En los resultados del presente trabajo se podría pensar en una derivación de la energía hacia la generación de mecanismos de protección en las branquias y hacia una mayor actividad detoxificante en el hígado, invirtiendo menos en el desarrollo de las crías. Si el fármaco afecta al animal de forma sistémica al punto de mostrar un estrés excesivo, éste no va a poder desviar la energía necesaria a la gestación adecuada de sus crías.

En definitiva, las alteraciones registradas no solo afectan la calidad de vida de los animales, sino también su potencial reproductivo. Por lo tanto, resulta fundamental hacer estudios integrales del impacto que puede tener el DCF, así como otros contaminantes de preocupación emergente, sobre la fauna acuática, al realizar evaluaciones de riesgo ambientales.

Diseño experimental

El punto final establecido *a priori* para llevar a cabo el tercer objetivo específico fue el de evaluar la cantidad y calidad de juveniles provenientes de una segunda camada, gestada completamente bajo exposición al fármaco. Sin embargo, no se pudo aplicar el diseño como se estableció previamente dado que las hembras no tuvieron el comportamiento de puesta esperado para la producción de una segunda camada. Por lo tanto, se estableció un punto final humanitario a las diez semanas de exposición.

Resulta importante hacer hincapié en la decisión de cambiar el punto final experimental por el humanitario. En 1959 se publicó la “regla de las 3 R”, de la mano del concepto de bienestar animal (Russell y Burch, 1959). Esta regla se aplica a los vertebrados y

cefalópodos, catalogados como animales sintientes según la CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), y establece el uso justificado, limitado y controlado de animales en el laboratorio. En primer lugar, esta regla menciona el **reemplazo** de animales sintientes por animales no sintientes, cultivos celulares o nuevas técnicas experimentales que incluyan implementos tecnológicos. Luego, aconseja la **reducción** de la cantidad de réplicas, pero sin dejar de tener validez estadística. Y finalmente se refiere al **refinamiento**. Este último concepto hace referencia a minimizar el sufrimiento, dolor y estrés del animal, y maximizar su bienestar y el enriquecimiento del medio. En este sentido, surge la idea del punto final humanitario, que depende del bienestar del animal, a diferencia del punto final experimental, que depende del objetivo del experimento. En el presente trabajo, al evidenciarse que el objetivo experimental no se iba a alcanzar en los tiempos estipulados, se decidió interrumpir el ensayo a las diez semanas ante la posibilidad de que los animales estuvieran sufriendo un estrés innecesario.

Si bien la razón de que se haya extendido tanto el tiempo hasta la producción de la segunda camada es desconocido, se pueden esbozar algunas hipótesis. Entre los factores de estrés a los que estaban sometidos los animales se incluyen la individualización y la falta de enriquecimiento del medio. Podría pensarse en un diseño en el que la unidad experimental consista en más de un ejemplar por pecera y enriquecer el medio con algún elemento no adsorbente. Por otra parte, a pesar de que todas las hembras seleccionadas presentaban un abdomen engrosado, no todas contenían embriones. Teniendo en cuenta este aspecto, en futuros estudios sería necesario redefinir el criterio de selección de las hembras, sumando algunos otros indicadores de gravidez, o bien planificar sesiones periódicas de apareamiento. Estos cambios permitirían asegurar el ingreso de hembras grávidas al ensayo.

En resumen, *P. reticulata* resultó ser una especie más sensible al DCF. Aún en la concentración ambientalmente relevante se observó una gran variedad de efectos histopatológicos y sobre el desarrollo de las crías. Teniendo en cuenta las modificaciones del diseño experimental propuestas para mejorar las condiciones del ensayo, esta especie resulta un buen modelo biológico para evaluar el impacto del DCF sobre peces ovovivíparos.

Conclusiones

Se enumeran a continuación las principales conclusiones derivadas del trabajo de tesis realizado:

- ✓ El diclofenac, en un rango entre 10 y 1000 µg/L, es capaz de afectar el potencial reproductivo de *Daphnia magna*, en términos de un menor promedio de crías por camada, de un incremento de la mortalidad y de la incidencia de malformaciones en neonatos, según se observó a los 16 días de exposición.
- ✓ Dado que la menor producción de crías de *D. magna*, así como la incidencia significativa de ciertas malformaciones (e.g., espina dorsal curvada), se observaron a la menor concentración ensayada (10 µg/L), se concluye que el diclofenac sería capaz de producir tales efectos en esta especie en el ambiente natural.
- ✓ La disminución de la progenie de *D. magna* sugiere que el diclofenac podría actuar como un agente estresante capaz de inducir un desbalance energético, afectando la inversión en la reproducción y el desarrollo de la descendencia.
- ✓ Las malformaciones observadas en el exoesqueleto de los neonatos de *D. magna* sugieren que el diclofenac podría actuar como un desorganizador endocrino, interfiriendo con el control que ejerce la ecdisona.
- ✓ Dado que los efectos observados en *D. magna* a los 16 días de exposición no fueron significativos a los 21 días, se concluye que podría existir una ventana de susceptibilidad al fármaco en los primeros 16 días de vida de los parentales de esta especie.
- ✓ La detección de malformaciones y la reducción de la talla de juveniles de *Poecilia reticulata* nacidos de la segunda camada de hembras expuestas por 10 semanas a la menor concentración (10 µg/L) permite concluir que el diclofenac es capaz de alterar el desarrollo y la calidad de la gestación, presumiblemente actuando como un agente estresante que afecta la inversión energética, entre otros efectos.
- ✓ A los tiempos y concentraciones ensayadas, el diclofenac es capaz de producir efectos histopatológicos significativos en branquias e hígado de *P. reticulata*, tales como desprendimiento del epitelio, irrigación aumentada, telangiectasia, aumento del número de células mucosas y fusión de las lamelas secundarias (en branquias); mayor congestión de hepatocitos, reducción de las vacuolas contenido glucógeno, mayor basofilia del citoplasma y mayor incidencia de espacios intercelulares (en hígado).

Referencias bibliográficas

- Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J. R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., & Barceló, D. (2015). Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment International*, 85, 327–333.
- Ajima, M. N., Ogo, O. A., Audu, B. S., & Ugwoegbu, K. C. (2015). Chronic diclofenac (DCF) exposure alters both enzymatic and haematological profile of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(4), 383-390.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewaters*, 18th Ed. American Public Health Association, Washington D.C. 1200 pp.
- Antunes, A. M., Rocha, T. L., Pires, F. S., de Freitas, M. A., Leite, V. R. M. C., Arana, S., Moreira, P. C., & Sabóia-Morais, S. M. T. (2017). Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. *Journal of Applied Toxicology*, 37(9), 1098–1107.
- Baer, K. N., & Goulden, C. E. (1998). Evaluation of a high-hardness COMBO medium and frozen algae for *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 39(3), 201-206.
- Bhandari, K., & Venables, B. (2011). Ibuprofen bioconcentration and prostaglandin E2 levels in the bluntnose minnow *Pimephales notatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 153(2), 251–257.
- Blazer, V. S. (2002). Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 85-101.
- Bonnefille, B., Gomez, E., Courant, F., Escande, A., & Fenet, H. (2018). Diclofenac in the marine environment: a review of its occurrence and effects. *Marine pollution bulletin*, 131, 496-506.
- Bouissou-Schurtz, C., Houeto, P., Guerbet, M., Bachelot, M., Casellas, C., Mauclaire, A. C., Panetier, P., Delval, C., & Masset, D. (2014). Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(3), 296–303.
- Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., & Lowerre-Barbieri, S. K. (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, 3(1), 52-70.
- Campuzano-Caballero, J. C., & Uribe, M. C. (2014). Structure of the female gonoduct of the viviparous teleost *Poecilia reticulata* (Poeciliidae) during nongestation and gestation stages. *Journal of Morphology*, 275(3), 247–257.
- Cantú, S. M., Lee, H. J., Donoso, A., Puyó, A. M., & Peredo, H. A. (2017). El ácido araquidónico y sus derivados: generalidades de los prostanoides en relación con procesos inflamatorios. *Ciencia e Investigación [Internet]*, 67(4), 5-12.
- Cleavers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142(3), 185–194.
- Deacon, A. (2023). *Poecilia reticulata* (guppy). *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompndium.682>
- Domenici, P., Herbert, N. A., Lefrançois, C., Steffensen, J. F., & McKenzie, D. J. (2013). The effect of hypoxia on fish swimming performance and behaviour. *Swimming physiology of fish: Towards using exercise to farm a fit fish in sustainable aquaculture*, 129-159.

- Dos Santos Almeida, S., Rocha, T. L., Qualhato, G., Oliveira, L. D. A. R., do Amaral, C. L., da Conceicao, E. C., ... & Bailão, E. F. L. C. (2019). Acute exposure to environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induced genotoxicity in *Poecilia reticulata*. *Aquatic toxicology*, 216, 105293.
- Du, J., Mei, C. F., Ying, G. G., & Xu, M. Y. (2016). Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97(1), 84–90.
- Ebert, D. (2005). *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia*. National Library of Medicine.
- Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P., & Ronco, A. E. (2013). Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(4), 397–400.
- Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P., & Ronco, A. E. (2013). Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. *International Journal of Environment and Health*, 6(4), 330-339.
- Evans, T. J. (2022). Endocrine disruption. In *Reproductive and developmental toxicology* (pp. 1163-1182). Academic Press.
- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology*, 76(2), 122-159.
- Fisher, M. M., & Eugster, E. A. (2014). What is in our environment that effects puberty?. *Reproductive Toxicology*, 44, 7-14.
- Freeman, W. H., & Bracegirdle, B. (1971). An atlas of invertebrate structure. *CABI Digital Library*.
- Gagné, F., Blaise, C., & Pellerin, J. (2005). Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus* sp. collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. *Environmental Research*, 98(1), 89-99.
- Gamarra Jr, J. S., Godoi, A. F. L., de Vasconcelos, E. C., de Souza, K. M. T., & de Oliveira, C. M. R. (2015). Environmental Risk Assessment (ERA) of diclofenac and ibuprofen: A public health perspective. *Chemosphere*, 120, 462-469.
- Gan, T. J. (2010). Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current medical research and opinion*, 26(7), 1715-1731.
- Genten, F., Terwinghe, E., & Danguy, A. (2009). *Atlas of fish histology*. CRC Press.
- Gomes, I. B., Simões, L. C., & Simões, M. (2018). The effects of emerging environmental contaminants on *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from drinking water in planktonic and sessile states. *Science of the Total Environment*, 643, 1348–1356.
- Gonzalez-Rey, M., & Bebianno, M. J. (2014). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 148, 818–831.
- Griboff, J., Carrizo, J. C., Bonansea, R. I., Valdés, M. E., Wunderlin, D. A., & Amé, M. V. (2020). Multiantibiotic residues in commercial fish from Argentina. The presence of mixtures of antibiotics in edible fish, a challenge to health risk assessment. *Food Chemistry*, 332.
- Grier, H. J., Uribe, M. C., lo Nstro, F. L., Mims, S. D., & Parenti, L. R. (2016). Conserved form and function of the germinal epithelium through 500 million years of vertebrate evolution. *Journal of Morphology*, 277(8), 1014–1044.
- Gröner, F., Höhne, C., Kleiner, W., & Kloas, W. (2017). Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 166, 473-481.

- Gupta, B. K., Sarkar, U. K., Bhardwaj, S. K., & Pal, A. (2011). Condition factor, length-weight and length-length relationships of an endangered fish *Ompok pabda* (Hamilton 1822) (Siluriformes: Siluridae) from the River Gomti, a tributary of the River Ganga, India. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(3), 962-964.
- Halling-Sørensen, B. N. N. S., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Lützhøft, H. H., & Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. *Chemosphere*, 36(2), 357-393.
- Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, K., Khim, J. S., Zhang, X., & Giesy, J. P. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Toxicology*, 98(3), 256–264.
- Hanazato, T. (1998). Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. *Chemosphere*, 36(8), 1903-1909.
- Hanazato, T. (2001). Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution*, 112(1), 1-10.
- Hassan, M. M., Qin, J. G., & Li, X. (2016). Spermatozeugmata structure and dissociation of the Australian flat oyster *Ostrea angasi*: Implications for reproductive strategy. *Tissue and Cell*, 48(3), 152–159.
- Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D. R., & Hitzfeld, B. (2005). Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*). *Aquatic Toxicology*, 75(1), 53–64.
- Huerta, B., Jakimska, A., Llorca, M., Ruhí, A., Margoutidis, G., Acuña, V., ... & Barcelò, D. (2015). Development of an extraction and purification method for the determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates. *Talanta*, 132, 373-381.
- Huamán, V. (2017). Crecimiento poblacional de *Daphnia magna* “pulga de agua” en cultivo experimental alimentado con *Saccharomyces cerevisiae* “levadura” y jugo de *Spinacia oleracea* “espinaca”. *Escuela profesional de biología*.
- Kantham, K. P. L., & Richards, R. H. (1995). Effect of buffers on the gill structure of common carp, *Cyprinus carpio* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 18(5), 411-423.
- Kleiven, O. T., Larsson, P., & Hobæk, A. (1992). Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos*, 197-206.
- Kobayashi, H., & Iwamatsu, T. (2002). Fine structure of the storage micropocket of spermatozoa in the ovary of the guppy *Poecilia reticulata*. *Zoological Science*, 19(5), 545–555.
- Koivisto, S. (1995). Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?. *Environmental Pollution*, 90(2), 263-267.
- Lambert, J. G. D. (1970). The ovary of the guppy *Poecilia reticulata*: the granulosa cells as sites of steroid biosynthesis. *General and Comparative Endocrinology*, 15(3), 464-476.
- Lawal, M. O. (2020). Growth pattern and length-weight relationship in *Poecilia reticulata* (Peters) (Poeciliidae) inhabiting the drainage canal system of Lagos Metropolis (Nigeria). *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*, 22(2), 73-86.
- Laws, S. C., Carey, S. A., Ferrell, J. M., Bodman, G. J., & Cooper, R. L. (2000). Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicological Sciences*, 54(1), 154-167.

- LeBlanc, G. A., Mu, X., & Rider, C. V. (2000). Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental health perspectives*, 108(12), 1133–1138.
- Lee, J., Ji, K., Lim Kho, Y., Kim, P., & Choi, K. (2011). Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1216–1225.
- Li, X., Wang, J., Ba, W., Zhang, S., Lin, Z., Gao, M., ... & Ru, S. (2022). Mechanistic revealing of reproductive behavior impairment in male guppy (*Poecilia reticulata*) induced by environmentally realistic 2, 2'-dithiobis-pyridine exposure. *Chemosphere*, 286, 131839.
- Lister, A. L. (2009). Prostaglandins in the zebrafish ovary: Role, regulation, and modulation by environmental pharmaceuticals (Doctoral dissertation, University of Guelph).
- Liu, Y., Wang, L., Pan, B., Wang, C., Bao, S., & Nie, X. (2017). Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 183, 104–113.
- Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4), 630–648.
- Mandic, M., Sloman, K. A., & Richards, J. G. (2009). Escaping to the surface: a phylogenetically independent analysis of hypoxia-induced respiratory behaviors in sculpins. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(6), 730–738.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M. T., & Laroche, J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicology*, 70(4), 327–343.
- Martínez-Jerónimo, F. (2012). Description of the individual growth of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) through the von Bertalanffy growth equation. Effect of photoperiod and temperature. *Limnology*, 13(1), 65–71.
- Mastrángelo, M. M., Valdés, M. E., Eissa, B., Ossana, N. A., Barceló, D., Sabater, S., ... & Giorgi, A. D. N. (2022). Occurrence and accumulation of pharmaceutical products in water and biota of urban lowland rivers. *Science of the Total Environment*, 828, 154303.
- Meijide F., Rey Vázquez G., Piazza Y., Babay P., Itria R. & Lo Nstro F. (2016). Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol and 4-tert-octylphenol on early life stages of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124: 82–90.
- Memmert, U., Peither, A., Burri, R., Weber, K., Schmidt, T., Sumpter, J. P., & Hartmann, A. (2013). Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(2), 442–452.
- Miège, C., Choubert, J. M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., & Coquery, M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. *Environmental Pollution*, 157(5), 1721–1726.
- Miller, T. H., Bury, N. R., Owen, S. F., MacRae, J. I., & Barron, L. P. (2018). A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environmental pollution*, 239, 129–146.
- Mirzaee, S. A., Noorimotlagh, Z., Ahmadi, M., Rahim, F., Martinez, S. S., Nourmohammadi, A., & Jaafarzadeh, N. (2021). The possible oxidative stress and DNA damage induced in Diclofenac-exposed Non-target organisms in the aquatic environment: A systematic review. *Ecological Indicators*, 131, 108172.
- Mishra, V. N. (2013). Xenoestrogens: The Curse of Civilization. *Medicine Update*. vol. 23, p. 816–820.

- Mittmann, B., Ungerer, P., Klann, M., Stollewerk, A., & Wolff, C. (2014). Development and staging of the water flea *Daphnia magna* (Straus, 1820; Cladocera, Daphniidae) based on morphological landmarks. *EvoDevo*, 5(1).
- Mohebi Derakhsh, P., Mashinchian Moradi, A., Sharifpour, I., & Jamili, S. (2020). Toxic effects of diclofenac on gills, liver and kidney of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(2), 735-747.
- Mu, X., & LeBlanc, G. A. (2002). Developmental toxicity of testosterone in the crustacean *Daphnia magna* involves anti-ecdysteroidal activity. *General and Comparative Endocrinology*, 129(2), 127-133.
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Dong, H., & Yang, H. (2019). Bioconcentration, behavioral, and biochemical effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 5704-5712.
- Nkoom, M., Lu, G., & Liu, J. (2022). Chronic toxicity of diclofenac, carbamazepine and their mixture to *Daphnia magna*: a comparative two-generational study. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(39), 58963-58979.
- Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. A., Shivaprasad, H. L., Ahmed, S., Chaudhry, M. J. I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., & Khan, A. A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427(6975), 630–633.
- OECD (2012), Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>.
- OECD (2019), Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>.
- Olmstead, A. W., & LeBlanc, G. A. (2000). Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(8), 2107-2113.
- Praskova, E., Plhalova, L., Chromcova, L., Stepanova, S., Bedanova, I., Blahova, J., ... & Svobodova, Z. (2014). Effects of subchronic exposure of diclofenac on growth, histopathological changes, and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*). *The Scientific World Journal*, 2014.
- Qualhato, G., de Sabóia-Morais, S. M. T., Silva, L. D., & Rocha, T. L. (2018). Melanomacrophage response and hepatic histopathologic biomarkers in the guppy *Poecilia reticulata* exposed to iron oxide (maghemite) nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, 198, 63-72.
- Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M., & Iqbal, H. M. N. (2019). Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. In *Environment International* (Vol. 122, pp. 52–66). Elsevier Ltd.
- Rastogi, A., Tiwari, M. K., & Ghangrekar, M. M. (2021). A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *Journal of Environmental Management*, 300, 113694.
- Rifkana, D. M. F., Gunawickrama, S. H. N. P., & Gunawickrama, K. B. S. (2019). Effects of waterborne Diclofenac on guppy (*Poecilia reticulata*): behavioural, histopathological, developmental and haematological approach under chronic laboratory exposure. *Basic & Applied Sciences*, 43.
- Ritschar, S., Bangalore Narayana, V. K., Rabus, M., & Laforsch, C. (2020). Uncovering the chemistry behind inducible morphological defences in the crustacean *Daphnia magna* via micro-Raman spectroscopy. *Scientific Reports*, 10(1), 22408.
- Rodríguez, E. M. (2024). Endocrine disruption in crustaceans: New findings and perspectives. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 585, 112189.

- Rojo, M., Álvarez-Muñoz, D., Dománico, A., Foti, R., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., & Carriquiriborde, P. (2019). Human pharmaceuticals in three major fish species from the Uruguay River (South America) with different feeding habits. *Environmental Pollution*, 252, 146–154.
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
- Sanamdikar, S. T., & Harne, K. R. (2012). Advanced method for sewage water treatment. *International Journal of Advanced Technology in Civil Engineering*, 1(2), 94-8.
- Sandström, P. (2022). Effects of Diclofenac on Fish Behavior: A Meta-Analysis (Dissertation). Tomado de <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:umu:diva-198866>
- Santos, L. H., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 175(1-3), 45-95.
- Sathishkumar, P., Meena, R. A. A., Palanisami, T., Ashokkumar, V., Palvannan, T., & Gu, F. L. (2020). Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota-a review. *Science of the total environment*, 698, 134057.
- Sauvé, S., Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1-7.
- Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., von der Ohe, P. C., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., Streck, G., & Brack, W. (2010). Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environmental Pollution*, 158(5), 1461–1466.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., & Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 141-150.
- Schwarz, S., Schmieg, H., Scheurer, M., Köhler, H. R., & Triebeskorn, R. (2017). Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Science of the Total Environment*, 607, 1026-1036.
- Science Perspectives: Greening the pharmacy. New measures and research are needed to limit the ecological impact of pharmaceuticals. (2022). Vol 377, Issue 6603 pp. 259-260.
- Shah, D. D., & Sorathia, Z. H. (2020). Tramadol/diclofenac fixed-dose combination: a review of its use in severe acute pain. *Pain and Therapy*, 9(1), 113-128.
- Shahjahan, R. M., Ahmed, M. J., Begum, R. A., & Rashid, M. A. (2013). Breeding biology of guppy fish, *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) in the laboratory. *Journal of the Asiatic Society of Bangladesh, Science*, 39(2), 259-267.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1981). Biometry. Freeman, New York.
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., & Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine environmental research*, 79, 1-15.
- Tahara, D., & Yano, I. (2004). Maturation-related variations in prostaglandin and fatty acid content of ovary in the kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 137(4), 631–637.
- Tian, H., Li, Y., Wang, W., Zhao, F., Gao, S., & Ru, S. (2018). Sexual characteristics of male guppies *Poecilia reticulata* serve as effect biomarkers of estrogens. *Journal of Oceanology and Limnology*, 36(4), 1392-1400.

- Triebeskorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H. R., & Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 68(2), 151–166.
- Uribe, M. C., De la Rosa Cruz, G., García Alarcón, A., Campuzano Caballero, J. C., & Guzman Barcenas, M. G. (2019). Structures associated with oogenesis and embryonic development during intraovarian gestation in viviparous teleosts (Poeciliidae). *Fishes*, 4(2), 35.
- Valdés, M. E., Amé, M. V., Bistoni, M. de los A., & Wunderlin, D. A. (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.
- Valdez-Carrillo, M., Abrell, L., Ramírez-Hernández, J., Reyes-López, J. A., & Carreón-Diazconti, C. (2020). Pharmaceuticals as emerging contaminants in the aquatic environment of Latin America: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 44863-44891.
- Venkatesh, B., Tan, C. H., & Lam, T. J. (1992). Prostaglandin synthesis in vitro by ovarian follicles and extrafollicular tissue of the viviparous guppy (*Poecilia reticulata*) and its regulation. *Journal of Experimental Zoology*, 262(4), 405-413.
- Wang, H. Y., Olmstead, A. W., Li, H., & LeBlanc, G. A. (2005). The screening of chemicals for juvenoid-related endocrine activity using the water flea *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 74(3), 193–204.
- Weber, C. I. (Ed.). (1991). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms* (p. 197). Cincinnati, OH: Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency.
- Weis, J. S. (2015). Some physiological responses of crustaceans to toxicants. *The natural history of the Crustacea*, 4, 477-504.
- Wilkinson, J. L., Hooda, P. S., Barker, J., Barton, S., & Swinden, J. (2016). Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products, and other emerging contaminants: A review of environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(4), 336-381.
- Yokota, H., Higashi, K., Hanada, E., Matsuzaki, E., Tsuruda, Y., Suzuki, T., ... & Eguchi, S. (2017). Recovery from reproductive and morphological abnormalities in medaka (*Oryzias latipes*) following a 14-day exposure to diclofenac. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(12), 3277-3283.
- Zanitti, M., Medesani, D. A., Rodríguez, E. M., & López Greco, L. S. (2023). Long-term exposure of the red cherry shrimp *Neocaridina davidi* to diclofenac: impact on survival, growth, and reproductive potential. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 85(2), 181-190.
- Zenker, A., Cicero, M. R., Prestinaci, F., Bottone, P., & Carere, M. (2014). Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of environmental management*, 133, 378-387.
- Zhang, J. L., Zhang, C. N., Li, E. C., Jin, M. M., Huang, M. X., Cui, W., ... & Shi, Y. J. (2019). Triphenyltin exposure affects mating behaviors and attractiveness to females during mating in male guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 76-84.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores por abrirme las puertas de sus laboratorios, por confiar en mí, por todas las horas que le han dedicado a mi formación y por la buena predisposición que siempre tuvieron. Aprendí muchísimo en esta tesis gracias a ustedes, pero no solo rescato lo aprendido, sino también la contención que me dieron cuando me costaba ver la luz al final del túnel y la buena onda de todos los días, que me daba fuerzas para enfrentar las adversidades típicas de los ensayos experimentales. Por todo esto, gracias a Enrique, Yanina, Ariel y también a Fabiana, que cumplió un rol importantísimo a pesar de no ser directora oficial.

Dentro del ámbito de los laboratorios, quiero agradecer también a Ivi, Maru y Mede por sus consejos súper útiles, por su compañía en el día a día y por haberme hecho reír tanto. Son un grupo hermoso. Estoy muy contenta de haberlos conocido. Mención especial a Mede, por haber sido el mejor tutor de la historia.

También le agradezco a toda la gente del labo 50, tanto por darme una mano como por adoptarme como una más del grupo. Gracias Laura, Caro, Lia, Emily, Paul, Santi. Todos aportaron algo lindo en mi experiencia por el labo.

A la gente del labo de peces también, aunque no haya pasado tanto tiempo ahí, me recibieron con mucho cariño y siempre estuvieron dispuestos a resolver dudas, aportando desde su experiencia algunas cosas que me han servido mucho en este trabajo. Gracias Isma, Rodri, Cris, Gri, Fer, Gaby, Demi, Maga. También gracias a Ariadna, que fue fundamental para la parte de histología.

Quiero agradecer también a María Cristina Marinone, que se apareció una tarde por el labo diciendo “¿acá hay una chica que trabaja con daphnias?” y me regaló unas pipetas de vidrio modificadas por ella misma, que fueron indispensables para el ensayo. A veces una charla con una persona, aunque sea muy breve, puede cambiar sustancialmente el curso de las cosas.

Gracias a Dani, Gise y Caro (de nuevo), que además de coparse con ser mis jurados, fueron de las mejores docentes que tuve y, ahora que compartimos el rol de la docencia, me siguen enseñando desde otro lado. Fue un placer ser su estudiante y lo sigue siendo compartir el trabajo con ustedes.

Saliendo del mundo de Exactas, le quiero agradecer a mis papás. Desde que les dije que quería estudiar biología, me dieron todo su apoyo y amor (como siempre), y la etapa de la tesis no fue la excepción. Mamá, gracias por hacerme reír cuando las cosas no daban muy bien y por prestarme tu oído en las salidas nocturnas con Moro, dándome siempre sabios consejos. Papá, gracias por rescatarme de entre los apuntes y la computadora para disfrutar un mate juntos. Más de una vez, en esas meriendas compartidas, me has hecho ver las cosas desde otro punto de vista. A los dos, gracias por hacer que esos sean mis momentos favoritos del día. Los amo.

Y por último, a los que siempre estuvieron al lado mío cursando, comiendo en el pastito, “estudiando” en la biblioteca, pensando actividades para la ComBi, haciendo locuras como irnos a Luján, jugando en las noches de juegos, jugando juegos de rol, y me puedo ir más lejos en el tiempo, a los locos que se metían a olimpiadas conmigo, que iban a ferias otakus, que cantaban canciones volviendo del campo de deportes, que le ponían nombres a sus sables de esgrima, que me acompañaron a escuchar jazz... Escribo esto y soy consciente de que hago una selección muy fuerte de todos los momentos buenos que viví con ustedes porque no entrarían en una ni en cien páginas. Gracias por todas y cada una de las risas que me sacaron, por los abrazos, por escucharme, por contenerme, por aconsejarme, por preocuparse por mí, por demostrarme su cariño siempre. Mi vida no sería lo mismo sin cada uno de ustedes. Amigos, no se imaginan cuánto los quiero.