



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Efectos de la ivermectina, un antiparasitario de uso
masivo en producción animal, en una especie ictícola de
gran interés comercial**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas

Lic. Ismael Esteban Lozano

Directora de tesis: Dra. Fabiana Laura Lo Nostro
Codirector de tesis: Dr. Fernando Román de la Torre
Consejero de Estudios: Dr. Enrique Marcelo Rodríguez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires e Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA), CONICET-UBA.

Buenos Aires, 2023

Efectos de la ivermectina, un antiparasitario de uso masivo en producción animal, en una especie ictícola de gran interés comercial

Resumen

La ivermectina (IVM) es un fármaco antiparasitario de uso masivo utilizado en animales y en el hombre. Una vez suministrada la IVM, la mayor parte se excreta como el compuesto parental a través de las heces constituyendo la principal forma de ingreso en el ambiente. El sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), es un characiforme migratorio presente en numerosos ríos sudamericanos. El sábalo, de hábitos detritívoros, es el recurso ictico más abundante de la Cuenca del Plata. La explotación extensiva de ganado en la zona de humedales de la cuenca baja constituye un potencial riesgo para las comunidades, entre ellas los peces asociados a estos ambientes. La estrategia reproductiva del sábalo involucra la presencia de larvas y juveniles en lagunas de la planicie de inundación de los ríos donde conviven con la intensa actividad ganadera de las islas, donde la ivermectina es de aplicación habitual. En este contexto se evaluó la problemática ambiental del antiparasitario IVM con un enfoque fisiológico, ecológico y comportamental en larvas y juveniles del sábalo utilizando diseños experimentales en laboratorio (agudo y subcrónico). La exposición de juveniles (en agua y en sedimentos) con niveles ambientales de IVM afectó los procesos de biotransformación y promovió el daño oxidativo en hígado, branquias y encéfalo, e impactó en el comportamiento natatorio (velocidad de escape, velocidad de natación de rutina y actividad general). En el área de estudio se detectaron niveles cuantificables de IVM. Los efectos observados en la natación mostraron un potencial impacto en la población de sábalos modelada en un análisis virtual de poblaciones.

Palabras clave: sábalos, baja cuenca del Río de la Plata, antiparasitarios, ivermectina, química ambiental, estrés oxidativo, comportamiento natatorio, ecotoxicología poblacional.

Effects of ivermectin, an antiparasitic widely used in animal production, on a main inland fisheries species

Abstract

Ivermectin (IVM) is a widely used antiparasitic drug used in animals and humans. Most of the IVM is excreted unaltered in the feces by the treated animal being the main path of entrance into the environment. The sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), is a migratory characiform fish present in numerous South American rivers. The sábalo has a detritivorous diet and it is the most abundant fish resource in the Cuenca del Plata. The extensive exploitation of livestock in the wetland area of the lower basin constitutes a potential risk for the fish communities associated with this environment. The reproductive strategy of the sábalo involves the presence of larvae and juveniles in floodplain lakes of the rivers where they coexist with the intense cattle activity on the islands, where IVM is commonly applied. In this context, the environmental impacts of the antiparasitic IVM was evaluated using a physiological, ecological and behavioral approach in *P. lineatus* larvae and juveniles using experimental designs in the laboratory (acute and subchronic exposures). The exposure of juveniles (in water and sediments) with environmental relevant concentrations of IVM affected the biotransformation processes and promoted oxidative damage in the liver, gills and brain; and impacted swimming behavior (escape velocity, routine swimming speed, and general activity). Measurable levels of IVM were detected in the study area. Based on the effects on swimming behavior, using a virtual population analysis, a potential impact on the sábalo population was observed.

Keywords: sábalo, low Rio de la Plata basin, antiparasitic, ivermectin, environmental chemistry, oxidative stress, swimming behavior, population ecotoxicology.

Agradecimientos

Para que la presente tesis haya sido posible, hay un ejército de seres humanos y voluntades que de una manera u otra han contribuido al éxito (o no-fracaso) de esta ardua pero gratificante tarea. Es así como dedico estas breves palabras de agradecimiento a:

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por brindarme el espacio de formación donde no solo realicé esta tesis y este doctorado, sino donde me formé como biólogo, investigador y persona.

Al CONICET que me brindó el sustento económico para poder dedicarme al desarrollo de este trabajo de Tesis.

A mi Directora (con mayúsculas obviamente) la Dra. Fabiana Lo Nostro, por sumarse a esta incierta aventura, allá por mediados de 2016, donde todo esto era un mezcla de desvarío, escamas y fármacos. La Dra. Lo Nostro no solo abre las puertas de su laboratorio a quien lo necesite sino las de su corazón (que por cierto es muy grande), brindando su apoyo, recursos, experiencia o sus oídos. ¡No podría encontrar a alguien mejor para semejante tarea!

A mi co-Director el Dr. Fernando de la Torre, quien se sumó a este proyecto sin saber a ciencia cierta cuánta agua había (metafórica y literalmente) para zambullirse y pescar. Sus ideas y experiencia (que jamás dudó en compartir) fueron una pieza central en toda esta tesis.

Al Dr. (y director espiritual) Carlos Fuentes, autor intelectual original de la pregunta “¿le hará algo la ivermectina a los peces?”.

También agradezco a mis ex compañeros de la Dirección de Pesca Continental (“El Lazareto”) la Dra. Inés Gómez, la Dra. Yanina Piazzza y la Dra. Sabina Llamazares Vegh con quienes, junto al Dr. Fuentes y sus locas ideas, realizamos los primeros muestreos y campañas de esta tesis. Sin ellos los primeros pasos de esta tesis nunca los hubiera podido dar.

A mi familia científica, mis compañeros del grupo de Ecotoxicología Acuática, los que están y los que estuvieron durante el desarrollo de esta Tesis: Graciela Rey Vázquez, Griselda Genovese, Yanina Piazzza, Rodrigo Da Cuña, Fernando Meijide, Cristina Czuchlej, Gabriela Chalimoniuk, Magali Leis, Demian Marrone. A todos y cada uno muchas gracias por las horas de trabajo compartidas, mates, tortas de cumple, alfajores, y por hacer del laboratorio un lugar ameno de trabajo.

A mi segunda casa doctoral, el Grupo de Estudios de Contaminación Antrópica en Peces (GECAP) donde aprendí todo lo que sé sobre estrés oxidativo, pruebas extras y almuerzos largos. ¡Especiales agradecimientos para Emanuel Sager, Paola Scarzia, Antonella Santillán Deiú, Laureno Loch y Aldana Lagraña!

A la Universidad Nacional de Luján, por abrirme las puertas y brindarme el lugar y equipamiento, amigos y un Director, todos necesarios para realizar esta Tesis.

A la Dra. Paola Babay de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) por permitirme acceder a sus laboratorios, brindarme sus equipos y entrenarme en la química analítica.

Al Dr. Damián Marino y su grupo en el Centro de Estudios del Medio Ambiente (CIMA), por no solo procesar nuestras muestras ambientales, sino por compartir todos sus saberes y experiencias y permitirme “aprender haciendo” en su laboratorio.

Al Lic. Hernán Lozano (alias mi hermano) por facilitarme las instalaciones de su laboratorio para el acondicionamiento de las muestras de sedimentos y por el asesoramiento estadístico.

A la Dr. Enrique Rodríguez por su apoyo como consejero de estudios.

A los señores Nelson Yapura y Antonio Tonso, grandes pescadores del río Paraná, que nos abrieron las puertas de su hogar de par en par y nos compartieron toda su sapiencia del río y de los peces.

A la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC), la cual supo brindar un saludable espacio de intercambio científico y académico a través de congresos, reuniones y eventos en los que he tenido el gusto de compartir gran parte de los resultados de esta tesis.

A mi familia, por su continuo apoyo y acompañamiento a lo largo de toda mi vida y por haberme dado la posibilidad de hacer de mi pasión por la biología una carrera. Gracias por haber incubado tres “exactos” en casa y por estar nuevamente escuchándome hablar tanto de los peces.

A mi segunda familia, el grupo scout Nuestra Señora del Carmen por haberme brindado el amor y la pasión por la naturaleza cuando era un niño que hizo que me decida estudiar la ciencia de la vida. Gracias por festejar conmigo cada logro y acompañarme en los momentos felices.

Y por supuesto a mi querida esposa Sabrina Lescano, mi compañera de la vida, del amor y de todo lo que está bien. Desde hace más de 18 años acompañando a este aspirante a científico a realizar sus sueños, siendo testigo de éxitos, fracasos, alegrías e incluso ¡otra tesis! Gracias por ser...

Contenido

Resumen	1
Abstract.....	2
Agradecimientos.....	3
Contribuciones científicas en el marco del presente trabajo de tesis	11
Introducción general	13
Contaminantes de preocupación emergente.....	14
El antiparasitario ivermectina	14
Presencia de ivermectina en el ambiente	17
Efectos de la ivermectina en especies no blanco	19
Escenario ambiental: la ganadería de islas.....	21
Especie clave en el ecosistema: el sábalo	23
Bibliografía.....	25
Hipótesis y objetivos.....	33
Hipótesis de trabajo.....	34
Objetivo general	34
Objetivos específicos	34
En el ambiente.....	34
En el laboratorio	34
Capítulo 1:.....	35
Niveles de ivermectina detectados en los compartimentos ambientales	35
El monitoreo ambiental.....	36
Presencia de fármacos para uso veterinario en el ambiente.....	36
La ivermectina en el ambiente: usos en ganadería de islas en la planicie de inundación de la cuenca del Plata	36
Metodología	37
Área de estudio.....	37
Estimación teórica de la concentración ambiental de ivermectina	39
Muestreo ambiental	40
Agua y sólidos en suspensión	42
Sedimentos	43
Captura de juveniles	44
Cuantificación de la ivermectina	44

Muestras de agua: extracción en fase sólida	44
Material particulado en suspensión: método de sonicación y extracción.....	45
Sedimentos: método multirresiduos QuEChERS	46
Músculo de peces: método multirresiduos QuEChERS	47
Análisis cromatográfico e instrumental utilizado	47
Resultados	48
Concentración ambiental prevista de ivermectina (PEC).....	48
Muestreo ambiental	49
Variabilidad ambiental y fisonomía de los sitios de muestreo	49
Captura de juveniles de sábalo.....	50
Parámetros fisicoquímicos de los sitios muestreados	51
Concentración ambiental de la ivermectina	51
Discusión.....	51
Variabilidad ambiental.....	51
Estimación teórica de la concentración ambiental de ivermectina	52
Concentración ambiental de la ivermectina en el sistema isla El Espinillo-La Invernada	53
Bibliografía.....	54
<i>Capítulo 2:</i>	58
<i>Efectos de la ivermectina en juveniles de Prochilodus lineatus</i>	58
Introducción.....	59
El uso de los ensayos biológicos en laboratorio	59
Los biomarcadores como herramienta para evaluar la exposición a contaminantes ambientales	60
Biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo	61
Biomarcadores de neurotoxicidad	65
Biomarcadores comportamentales	66
Biomarcadores histológicos.....	69
Biomarcadores hematológicos	71
Biomarcadores isotópicos	73
Los biomarcadores y el efecto de la escala: enfoque multinivel o de respuesta múltiple.....	74
El valor de los peces como bioindicadores de contaminación.....	75
Metodología	76

Obtención de los ejemplares	76
Estabilidad de la ivermectina en condiciones experimentales	77
Aclimatación de los ejemplares	79
1) Toxicidad letal aguda de la ivermectina en agua	80
2) Exposición <i>ex vivo</i> de branquias	81
3) Toxicidad subletal subcrónica de la ivermectina en agua	82
4) Toxicidad subletal subcrónica en agua y sedimentos fortificados.....	84
Biomarcadores evaluados	87
Factor de condición	87
Índice hepatosomático	87
Biomarcadores bioquímicos de biotransformación y de estrés oxidativo	87
Biomarcadores bioquímicos de neurotoxicidad.....	91
Acetilcolinesterasa.....	91
Concentración de proteínas en la fracción soluble libre de mitocondrias.....	91
Biomarcadores comportamentales	91
Biomarcadores histológicos.....	93
Biomarcadores hematológicos	94
Biomarcadores isotópicos	97
Tratamiento estadístico de los datos	98
Resultados	99
Estabilidad de la ivermectina en condiciones experimentales	99
Toxicidad letal aguda de la ivermectina en agua	101
Exposición <i>ex vivo</i> de branquias de <i>Prochilodus lineatus</i>	102
Toxicidad subletal subcrónica de la ivermectina en agua: 15 días de exposición ...	104
Índices fisiológicos y morfométricos	104
Biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo	104
Biomarcadores comportamentales: comportamiento natatorio	106
Biomarcadores hematológicos	108
Análisis discriminante (estadística multivariada)	108
Toxicidad subletal subcrónica de la ivermectina en agua: 30 días de exposición ...	110
Índices fisiológicos y morfométricos	110
Biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo	111
Biomarcadores comportamentales: comportamiento natatorio	114

Biomarcadores histológicos.....	115
Biomarcadores hematológicos	116
Biomarcadores isotópicos: señales isotópicas de carbono y nitrógeno	116
Análisis discriminante (estadística multivariada)	117
Toxicidad subletal subcrónica en agua y sedimentos fortificados.....	118
Parámetros de calidad del agua	119
Análisis químico	119
Índices fisiológicos y morfométricos	120
Biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo.....	120
Biomarcadores isotópicos: señales isotópicas de carbono y nitrógeno	123
Análisis discriminante (estadística multivariada)	124
Discusión.....	125
Concentración de ivermectina en condiciones experimentales: agua y sedimentos	125
Efectos de la ivermectina sobre los biomarcadores.....	126
Efectos de la ivermectina sobre los biomarcadores de estrés oxidativo	127
Efectos de la ivermectina sobre biomarcadores comportamentales	130
Efectos de la ivermectina sobre biomarcadores hematológicos	131
Integración de los efectos de la ivermectina sobre los biomarcadores.....	132
Representatividad de los diseños experimentales.....	132
Bibliografía.....	133
<i>Capítulo 3:</i>	158
<i>Efectos de la ivermectina en la población de sábalos</i>	<i>158</i>
Introducción.....	159
Modelos poblaciones en biología pesquera	159
El sábalo en las pesquerías argentinas	159
El impacto de los contaminantes en la dinámica poblacional	160
Materiales y métodos.....	161
Datos de captura	161
Modelo de Poblaciones Virtuales (VPA)-Ingreso de datos.....	163
Inclusión de biomarcadores comportamentales en el VPA	164
Resultados	165
Estimación inicial de los parámetros	165
Aplicación del VPA	166

Modelado de la población con y sin efectos de la ivermectina	167
Discusión.....	168
Estado del stock pesquero del sábalo	168
Incertezas y fuentes de variabilidad en el modelado.....	168
Fiabilidad y precisión del análisis virtual de poblaciones para la estimación de la abundancia de sábalo	169
Efectos de la ivermectina en la abundancia de la población	169
Bibliografía.....	170
Conclusiones generales	175
En el ambiente.....	176
En el laboratorio	177
Análisis de las hipótesis propuestas	179
Anexo 1	180
Análisis cromatográficos de la ivermectina	180
Decaimiento de la ivermectina en condiciones experimentales: análisis cromatográficos	181
Curvas de calibración de solución de Ivermectina en metanol.....	181
Calibración del método de extracción de Ivermectina en agua.....	182
Decaimiento de la ivermectina en acuarios experimentales	182
Anexo 2	184
Técnicas histológicas	184
Protocolo de histológico de branquias de <i>Prochilodus lineatus</i>	185
Fijación.....	185
Inicial.....	185
Almacenamiento.....	185
Inclusión.....	185
Deshidratación e inclusión de las piezas	185
Coloración de hematoxilina-eosina	185
Desparafinado e hidratación	185
Coloración.....	185
Deshidratación.....	185
Coloración tricrómica de Masson modificada	186
Desparafinado e hidratación	186
Coloración	186

Deshidratación.....	186
Coloración Azul Alcían	186
Desparafinado e hidratación	186
Coloración.....	187
Deshidratación.....	187

Contribuciones científicas en el marco del presente trabajo de tesis

I) Publicaciones en revistas científicas

a) Trabajo publicado relacionado con la tesis

Lozano I, Piazza Y, Babay P, Sager E, de la Torre F, Lo Nostro F. 2021.

"Ivermectin: a multilevel approach to evaluate effects in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), an inland fishery species". Science of the Total Environment 800 (2021) 149515. ISSN: 0048-9697. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149515.

b) Trabajo enviado relacionado con la tesis

Lozano I.E., Lo Nostro F.L., Lagrãña A., Piazza Y., Czuchlej C., Marino, D., de la Torre, F.R. 2022

"Impact of antiparasitic used in livestock: effects of ivermectin spiked sediment in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), an inland fishery species"

c) Otros:

Piazza Y., Lozano I, Llamazares-Vegh S., Lo Nostro F, Fuentes C. 2022. "Integrative study of the reproductive biology and growth of *Acestrorhynchus pantaneiro* Menezes, 1992 (Characiformes, Acestrorhynchidae)". *Journal of Fish Biology*.

Llamazares Vegh, S., Lozano, I. E., Diaz, M. V., Gómez, M. I., Sánchez, S., y Fuentes, C. M. (2021). Effects of feeding condition on the morphology, behaviour and nutritional status of *Prochilodus lineatus* early larvae during downstream drift: a laboratory experiment approach. *Marine and Freshwater Research*, -. <https://doi.org/10.1071/MF20203>

Colautti, D.C., Miranda, L., Gonzalez-Castro, M., Villanova, V., Strüssmann, C.A., Mancini, M., Maiztegui, T., Berasain, G., Hattori, R., Grosman, F., Sanzano, P., Lozano I.E., Llamazares Vegh, S., Salinas, V., Del Ponti, O., Del Fresno, P., Minotti, P., Yamamoto, Y., Baigún, C.R.M. (2019). "Evidence of a landlocked reproducing population of the marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* (Actinopterygii; Atherinopsidae)". *Journal of Fish Biology*, 2019; 1–15.

Lozano, I.E., Llamazares Vegh, S., Gómez, M.I., Piazza, Y.G., Salva, J.L., Fuentes, C.M. (2019). "Episodic recruitment of young *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) during high flows in a floodplain lake of Paraná River, Argentina". *Fisheries Management and Ecology*, 26(3):260-268.

II) Presentaciones a reuniones científicas nacionales

- Lozano I., Santillan Deiu A., Lo Nostro F., de la Torre F. "Effects of the antiparasitic Ivermectin on oxidative stress biomarkers on a native fish species: an ex vivo approach". *12th SETAC Latinamerica Biennial Meeting*. Santos, Brasil. 7 al 10 de septiembre de 2017.
- Lozano I., Babay P., Santillán Deiu A., Sager E., de la torre F., Lo Nostro F. "Exposición al antiparasitario ivermectina: biomarcadores comportamentales y de estrés oxidativo en el sábalo *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes)". *VII SETAC Argentina*. San Luis, Argentina. Del 15 al 19 de octubre de 2018.

- Meijide F, Lozano I, Lo Nostro F. "Effects of waterborne exposure to the antidepressant fluoxetine on mosquitofish escape response". *13th SETAC Latinamerica Biennial Meeting*. Cartagena, Colombia. 15 al 19 de septiembre de 2019.
- Lozano I., Piazza Y., de la Torre F., Lo Nostro, F. "Efectos del antiparasitario ivermectina sobre la actividad natatoria del sábalo *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae)". *VI Simposio Argentino de Ictiología*. Bariloche, Argentina. 10 al 14 de noviembre de 2019.
- Piazza Y., Lozano I., Llamazares Vegh S., Lo Nostro F., Fuentes C. "Reproduction dynamic of the "pike characin" *Acestrorhynchus pantaneiro*: an approach based in adults and their offspring". *VI Simposio Argentino de Ictiología*. Bariloche, Argentina. 10 al 14 de noviembre de 2019.
- Lozano I, Piazza Y, Babay P, de la Torre F. Lo Nostro F. "The widespread used antiparasitic Ivermectin disrupts swimming behavior on the freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes)". *SETAC YES*. Texas, USA. Del 6 al 10 de marzo de 2020.
- Lozano I., Lagraña A., Lo Nostro F., de la Torre F. "Contaminated Sediments: Biochemical Effects and Oxidative Stress in the Sábalo *Prochilodus Lineatus*, Exposed to the Antiparasitic Ivermectin". *14th SETAC Latinamerica Biennial Meeting*. Virtual. Valdivia, Chile. 26 al 29 de septiembre de 2021.
- Lozano I., de la Torre F., Lo Nostro F. "Short vs. long-term exposure to ivermectin in the sábalo *Prochilodus lineatus*: the transient nature of early responses in a migratory fish". *VIII SETAC Argentina*. Mar del Plata, Argentina. Del 7 al 11 de marzo de 2022.
- Lozano, I.E.; Lagraña, A.; Lo Nostro, F.L. y de la Torre, F.R. "Sedimentos contaminados con antiparasitarios: respuestas bioquímicas y estrés oxidativo inducidas por exposición a ivermectina en el sábalo *Prochilodus lineatus* (Characiformes)". *VII Simposio Argentino de Ictiología*. Buenos Aires, Chascomús. Del 22 al 25 de noviembre de 2022.
- Piazza, Y.; Lozano I.; Batista A., Sánchez S. y Lo Nostro F. "Ontogenia del sistema visual de sábalo *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae; Characiformes)". *VII Simposio Argentino de Ictiología*. Buenos Aires, Chascomús. Del 22 al 25 de noviembre de 2022.

Introducción general

Contaminantes de preocupación emergente

Hoy en día miles de principios activos de sustancias de uso masivo se producen comercialmente, entre los cuales se puede encontrar una gran variedad de productos farmacológicos destinados a mejorar la salud animal y humana. Tras ser administrados, estos productos son parcialmente metabolizados por los organismos tratados. De esta manera, los fármacos y sus metabolitos, tras ser liberados por el organismo, pueden alcanzar fácilmente los distintos compartimentos ambientales (Rehman et al., 2015).

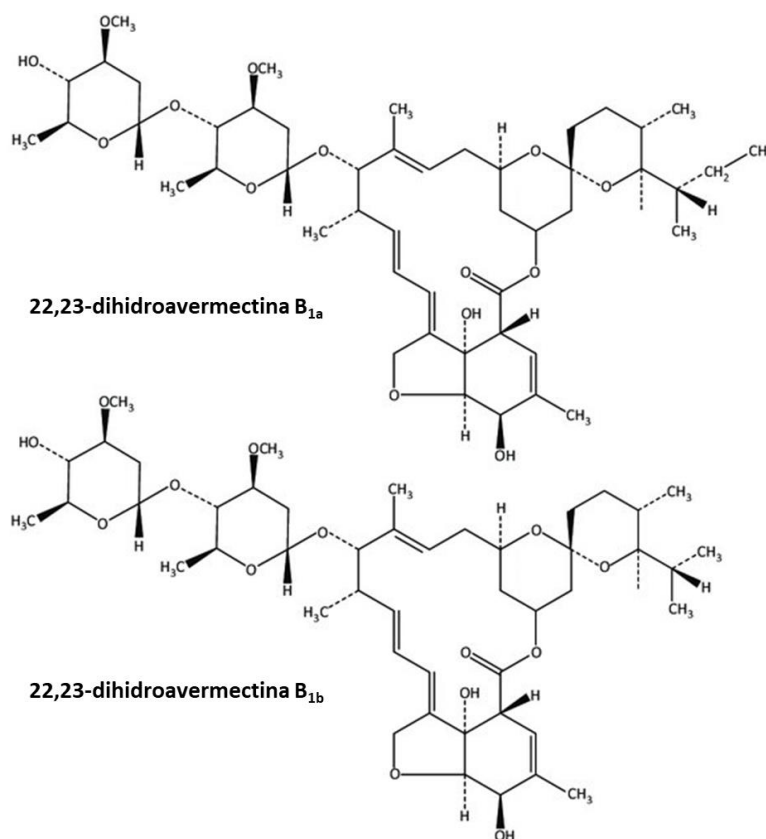
En el contexto de esta problemática ambiental, muchas de estas sustancias son consideradas contaminantes de “interés o preocupación emergente/reciente”. Bajo esta definición se encuentran productos químicos de origen natural, manufacturados o artificiales que se ha descubierto, o se sospecha, que están presentes en diversos compartimentos ambientales y cuya toxicidad o persistencia probablemente afecte significativamente el metabolismo de un ser vivo. Un contaminante seguirá siendo de tipo “emergente” mientras persista la escasez de información en la literatura científica, o ésta esté pobremente documentada, acerca de los potenciales impactos asociados a la presencia de dicho contaminante en el ambiente (Sauvé y Desrosiers, 2014).

El antiparasitario ivermectina

La ivermectina (IVM) (Figura 1) es una droga antiparasitaria endectocida de amplio espectro del grupo de las avermectinas. Esta familia de compuestos, pertenecientes al grupo de las lactonas macrocíclicas, fue aislada por la empresa Merck® en 1975 como producto de fermentación del microorganismo de suelo *Streptomyces avermitilis* (Campbell, 1989; Ōmura, 2008). El desarrollo de este fármaco le valió en el año 2015 el premio Nobel en Fisiología y Medicina a los Dres. Campbell, Ōmura y Tu.

Los endectocidas poseen acción sistémica (actúan a través de la sangre del hospedador), de contacto e incluso por ingestión, según cómo se administren (Junquera, 2015). La denominación endectocida deriva del hecho que, además de tratar infecciones por ectoparásitos, también son altamente eficaces contra numerosos parásitos internos o endoparásitos, sobre todo helmintos y nematodos (Ōmura, 2008; Junquera, 2015; Laing *et al.*, 2017). La IVM comenzó siendo utilizada principalmente en el control de nematodos y artrópodos que afectan a las especies ganaderas (Benz *et al.*, 1989). Debido a su amplio espectro, esta droga es utilizada extensivamente como tratamiento, en sus diversas aplicaciones (vía oral, inyecciones, vía tópica y otras formulaciones), prácticamente en todas las especies de animales

productivas y domésticas e incluso en el hombre (Ōmura, 2008); esto lo convierte en uno de los antiparasitarios de mayor uso en el mundo (Kövecses y Marcogliese, 2005; Ōmura, 2008).



Nombre IUPAC - 22,23-dihidroavermectina B_{1a} + 22,23-dihidroavermectina B_{1b}
 Formula – C₄₈H₇₄O₁₄ (22,23-dihidroavermectina B_{1a}) + C₄₇H₇₂O₁₄ (22,23-dihidroavermectina B_{1b})

Figura 1- Estructura química de la ivermectina. La ivermectina consiste en una mezcla de dos homólogos: 5-O-dimetil- 22,23-dihidroavermectina B_{1a} y B_{1b} en una proporción de 80:20. (Adaptado de Laing *et al.*, 2017).

El modo de acción principal de la IVM sobre los organismos blanco está mediado por un neurotransmisor ligado a los canales de cloro (Figura 2). Las avermectinas en general potencian y/o activan directamente los canales de cloro ligados al neurotransmisor Glutamato, presente únicamente en los nemátodos y artrópodos, generando un aumento de la permeabilidad de la membrana celular hacia los iones cloruro. Así, se estimula el influjo de iones cloruro dentro de las células nerviosas del parásito resultando en la pérdida de la función celular, lo que interrumpe el impulso nervioso, y por lo tanto produce la parálisis y posterior muerte en la mayoría de los invertebrados parásitos afectados (Ōmura, 2008).

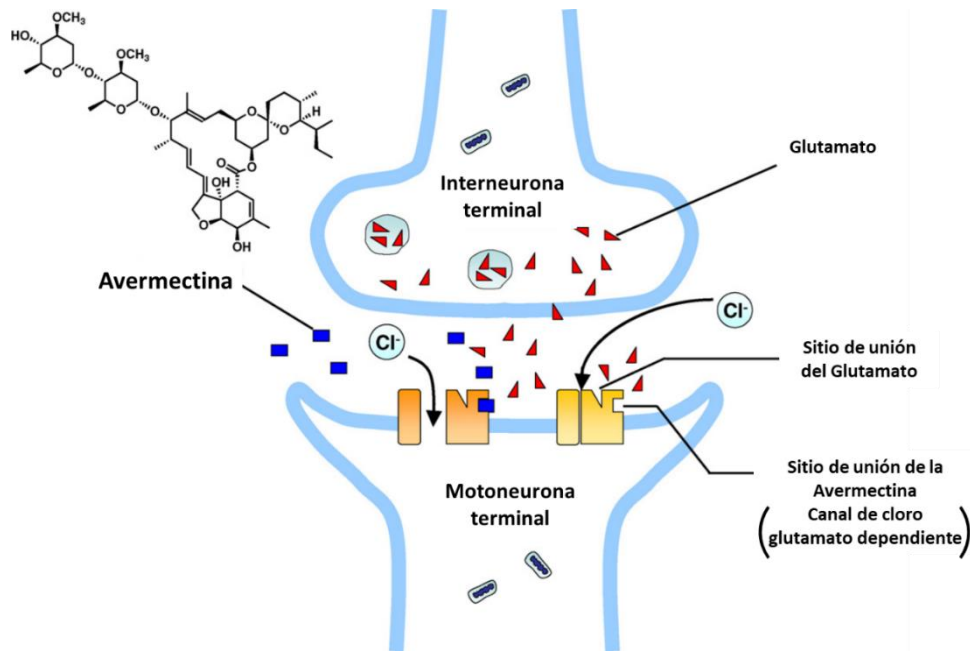


Figura 2- Mecanismo de acción de las avermectinas en la sinapsis de un nematodo. (Adaptado de Ōmura, 2008).

Los canales de cloro Glutamato-dependientes no se encuentran presentes en los vertebrados, confiriéndole a la IVM un amplio margen de seguridad. En los vertebrados, la IVM estimula la liberación de ácido gamma-aminobutírico (GABA) en las neuronas, pero como éstas suelen estar en el cerebro y, por lo tanto, protegidas por la barrera hematoencefálica, el fármaco ha sido considerado como seguro para los mamíferos (Ōmura, 2008). Sin embargo, a concentraciones micromolares, la IVM puede interactuar con un gran número de canales ionotrópicos (modulados por ligando) presentes tanto en invertebrados como en vertebrados, incluyendo GABA, la glicina, la histamina y los receptores nicotínicos (Wolstenholme y Rogers, 2005; Laing *et al.*, 2017). Por otro lado, algunos autores (Horsberg, 2012; Katharios *et al.*, 2004 y Høy *et al.*, 1990) sugieren que la IVM podría atravesar parcialmente la barrera hematoencefálica en peces.

Debido a su efectividad ante una amplia variedad de nematodos, ácaros e insectos (Strong y Brown, 1987; Ōmura, 2008), la IVM ha sido utilizada en ganadería, agricultura y horticultura para la protección de frutas, algodón, vegetales y plantas ornamentales (Dybas, 1989; Liebig *et al.*, 2010). En el campo de la acuicultura, la IVM se ha utilizado como tratamiento de enfermedades causadas por copépodos parásitos de la familia Caligidae (Palmer *et al.*, 1987; Campbell, 1989), crustáceos de la familia Argulidae (Hemaprasanth *et al.*, 2012) y platelmintos monogéneos (Alves *et al.*, 2019) entre otras patologías.

En el ámbito de la salud humana las avermectinas se han utilizado también como tratamiento para la patología denominada “ceguera de los ríos”, la Oncocercosis (Lindley, 1987). Mas recientemente, en un estudio *in vitro* (Caly *et al.*, 2020) la IVM fue descripta como un potencial antiviral contra el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causante de la última pandemia de coronavirus (COVID-19). Este hallazgo desencadenó una serie de trabajos clínicos cuyo fin era desarrollar tratamientos clínicos efectivos contra esta enfermedad, pero con distinto grado de éxito (Gupta *et al.*, 2020; Sharun *et al.*, 2020; Popp *et al.*, 2021). En este contexto, en Argentina y otros países de la región, se estudiaron diferentes alternativas terapéuticas con altas concentraciones de IVM (Krolewiecki *et al.*, 2021; Vallejos *et al.*, 2021) llegándose a implementar como tratamiento válido para la COVID-19 en Bolivia (Ministerio de Salud, Gobierno del Estado de Bolivia, 2020) y Perú (Ministerio de Salud, Republica del Peru, 2020) entre otras administraciones. Sin embargo, aún no hay un consenso claro acerca de su efectividad como tratamiento para la COVID-19 (Mega, 2020; Schmith *et al.*, 2020).

Presencia de ivermectina en el ambiente

La IVM puede ser administrada por vía oral, tópica (*pour-on*) o intramuscular. Las aplicaciones orales tienden a producir picos agudos de excreción, y la mayor parte de la dosis se excreta en unos pocos días (Liebig *et al.*, 2010; Mancini *et al.*, 2020). En cuanto a las vías de excreción, la IVM y sus metabolitos son excretados principalmente a través de las heces (90%) y solo el 1% en la orina (Halley *et al.*, 1989a; Chiu *et al.*, 1990; Macini *et al.*, 2020). Los máximos de eliminación de las formulaciones inyectables o tópicos suelen ocurrir entre los 2 y 7 días después del tratamiento, pudiendo mantenerse durante más de 4 a 6 semanas (Floate *et al.*, 2005). Estos mecanismos de eliminación constituyen la principal forma de ingreso de la IVM en el ambiente (Hennessy y Alvinerie 2002). Sin bien la legislación nacional argentina no contempla ni contiene niveles guía o máximos para la IVM en el ambiente, la Comisión Europea (European Commission N° 37/2010; actualizado en 2014 por European Medicines Agency) ha establecido una serie de límites para su concentración en músculo, tejido graso, hígado y riñones de animales tratados de 30, 100, 100 y 30 µg/kg respectivamente. Por otro lado, el uso agronómico de los residuos orgánicos de origen animal (heces y otros desechos) como fertilizante se ha convertido en una práctica agrícola común en la región (Ubacht *et al.*, 2005; Sosa *et al.*, 2016). Es así como la IVM puede ingresar en los suelos a través del esparcido de estiércol de animales tratados provenientes de la cría intensiva (ej.: feedlots) o criados en pasturas. De la misma manera, la IVM puede ser liberada directamente al agua a través de las heces y excretas de los animales tratados próximos a cuerpos de agua someros (ej.: ganadería de islas). La entrada

indirecta de la IVM al ambiente acuático puede ocurrir también a través de la lixiviación del suelo contaminado al agua subterránea o por medio de la escorrentía de pastos o tierras cultivables que contenían estiércol de animales tratados (Liebig *et al.*, 2010) (Figura 3).

Entre las propiedades fisicoquímicas a destacar, la IVM presenta un $\log K_{ow}$ de 3,2 (Bloom y Matheson, 1993) indicando una potencial capacidad de bioacumulación en los organismos (Mancini *et al.*, 2020). Por otro lado, con un coeficiente normalizado de absorción de carbono orgánico (K_{oc}) significativamente alto (Halley *et al.*, 1989b; Krogh *et al.*, 2008), la absorción de la IVM en suelo y materia orgánica es alta (Figura 3). Numerosos estudios dan cuenta de la alta persistencia de la IVM en mesocosmos, humedales y ambientes terrestres (Sanderson *et al.*, 2007; Mesa *et al.*, 2020; Wall y Strong, 1987). El tiempo medio de disipación (TD_{50}) en suelos puede ir desde los 16 a 1520 días dependiendo del tipo de suelo, la capacidad de sorción, la temperatura y el oxígeno disponible (Liebig *et al.*, 2010). La IVM puede ser muy persistente en mezclas de suelo con estiércol o heces (7 a 217 días) (Mancini *et al.*, 2020). En este contexto, se han registrado movimientos de la IVM desde el estiércol al suelo subyacente y a las plantas cercanas (Mancini *et al.*, 2020). De manera similar, se han detectado concentraciones de IVM en las raíces de macrófitas que viven en humedales sometidos a diferentes usos ganaderos y en raíces y hojas de plantas acuáticas en sistemas de acuicultura (Wang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). Las evidencias señalan que la IVM puede acumularse en las heces/estiércol, los sedimentos y el agua de los ambientes de humedales, representando una potencial amenaza para estos ecosistemas.

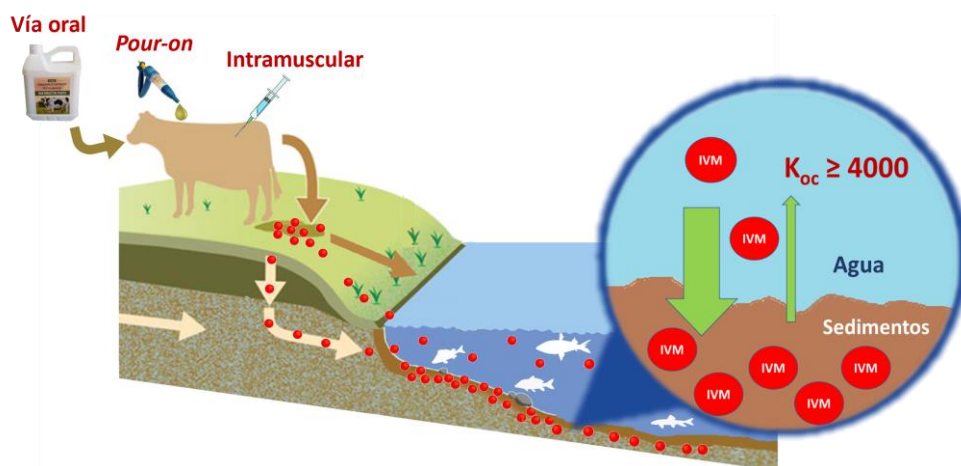


Figura 3- Diagrama de las principales vías de administración de la ivermectina en el ganado y su ingreso en los distintos compartimentos ambientales. Las flechas señalan los procesos de escorrentía y lixiviación que favorecen el desplazamiento de esta molécula a los cuerpos de agua adyacentes. En el panel derecho se ilustra la alta absorción de la ivermectina en suelos y sedimentos con respecto al agua.

Efectos de la ivermectina en especies no blanco

El uso masivo de la IVM como fármaco antiparasitario de ganado puede implicar una constante liberación de este fármaco en el ambiente. Como fue descrito anteriormente, la principal vía de eliminación de la IVM es a través de las heces de los animales tratados Halley *et al.*, 1989a; Chiu *et al.*, 1990; Macini *et al.*, 2020), pudiendo mantenerse en el ambiente por largos períodos de tiempo (Mancini *et al.*, 2020). A raíz de esto, muchas especies de insectos que habitan en las heces, o próximos a estas, pueden verse negativamente afectados por la presencia de la IVM. Entre las especies más afectadas se encuentran los escarabajos peloteros (Orden Coleoptera), que excavan las heces para la creación de “nidos” donde depositan sus huevos (Mancini *et al.*, 2020). Este comportamiento posee efectos significativamente positivos para el ambiente, a través de la eliminación mecánica de las heces y la fertilización de los suelos (Beynon *et al.*, 2015). Las primeras menciones de las problemáticas ambientales asociadas a la ivermectina y a la coprofauna iniciaron en la década de los 80's. Wall y Strong (1987) concluyeron que los animales tratados con dosis de 40 µg de IVM por Kg por día producían heces que no podían ser normalmente degradadas ni colonizadas por la coprofauna habitual. Estos autores observaron además que las alteraciones en la degradación de las heces se prolongaron por más de 100 días (tiempo total del experimento). Más recientemente Pecenka *et al.* (2019) identificaron una correlación negativa entre la cantidad de IVM en las heces del ganado y la abundancia y diversidad de escarabajos. En esta línea, Martínez *et al.* (2019) expusieron el escarabajo coprófago *Euoniticellus intermedius* a IVM (3,16, 10,0, 31,6, 63,2, 100 y 316 µg/kg de estiércol fresco) para determinar la toxicidad en adultos y larvas. Tras 10 días de exposición, las hembras adultas mostraron una disminución en la fecundidad en todas las concentraciones evaluados.

Se han observado efectos tóxicos asociados a la IVM en varias especies de invertebrados acuáticos y en microalgas (Mancini *et al.*, 2020; Liebig *et al.*, 2010). Garric *et al.* (2007) reportaron efectos altamente tóxicos de la IVM sobre el cladócono de agua dulce *D. magna* y en el alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*. Egeler *et al.*, (2010) analizaron la toxicidad crónica de la IVM resultando muy tóxica en dos especies de invertebrados de agua dulce: *Chironomus riparius* y *Lumbriculus variegatus*. Entre los crustáceos, los anfípodos han reportado una alta sensibilidad a la IVM, en particular *Gammarus pulex* y *Gammarus fossarum* (Alonso *et al.*, 2009). Daoud *et al.*, (2018) observaron una mortalidad del 100% en juveniles de la langosta americana *Homarus americanus* expuestos durante 25 días a sedimentos enriquecidos con IVM (61,0 y 300,0 ng/g de sedimento), viéndose efectos subletales aún a concentraciones menores (3,0; 6,4 y 14,7 ng/g de sedimento). En términos generales, la IVM reporta una alta toxicidad tanto

crónica como aguda para los crustáceos, con valores que oscilan entre los 5,7 ng/L a los 0,3 pg/L (Mancini *et al.*, 2020).

La estabilidad y persistencia de la IVM en sedimentos y aguas, especialmente en humedales, puede ser una fuente de exposición constante para algas y plantas (Mesa *et al.*, 2020). La fitotoxicidad de la IVM sobre algas y plantas ha sido reportada en trabajos recientes. En el ya mencionado trabajo de Garric *et al.* (2007) destinado a comparar los posibles efectos de IVM tanto en *D. magna* como en *P. subcapitata*, las algas mostraron una sensibilidad considerablemente menor que los cladóceros: solo a las concentraciones más altas evaluadas (1250 y 4000 µg/L) reportaron un efecto significativo en el crecimiento de algas. En este mismo sentido, Eichberg *et al.* (2016) reportaron una inhibición en la germinación en tres especies de pastizales (*Centaurea jacea*, *Galium verum*, *Plantago lanceolata*) expuestos a moxidectina, un fármaco antiparasitario perteneciente a la misma familia de la IVM. En un trabajo reciente, Vokřál *et al.* (2019) estudiaron los efectos de la IVM en la especie vegetal *Sinapis alba* a través de la prueba de germinación y de crecimiento radicular con dos concentraciones de IVM diferentes: 50 nM (0,044 µg/mL) y 500 nM (0,44 µg/mL). Los autores observaron fitotoxicidad en ambas concentraciones, con un 20 y 24% de inhibición para la concentración baja y alta respectivamente.

Numerosos estudios a lo largo de los años se han concentrado principalmente en las consecuencias del uso de la IVM en peces marinos. La IVM se ha utilizado tradicionalmente para el tratamiento de infecciones parasitarias causadas por el “piojo de mar” (*Lepeophtherius* sp. y *Caligus* sp), principalmente en la producción de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Mancini *et al.*, 2020). Estos copépodos ectoparásitos generan serios daños a la salud de los peces pudiendo causar grandes pérdidas económicas en las producciones acuícolas (Johnson *et al.*, 2004; Costello, 2009; Bravo *et al.*, 2015). Ucán-Marín *et al.* (2012) reportaron una serie efectos toxicológicos adversos en salmones expuestos a una dieta enriquecida con IVM con concentraciones similares a las utilizadas en acuicultura. La concentración letal 50 (CL₅₀) reportada por estos autores fue de 0,174 mg/Kg, solo tres veces más alta que la dosis operativa utilizada en acuicultura. Entre los efectos subletales registrados por los autores se observaron reducción de la movilidad y letargo, oscurecimiento de la piel, disminución de la tasa de ingesta, hepatotoxicidad, neurotoxicidad y caída del factor de condición. Las consecuencias negativas derivadas de la exposición a IVM también se han estudiado en especies de peces de agua dulce. En la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), una especie de gran interés acuícola, Liebig *et al.* (2010) reportaron un CL₅₀ de 3,0 µg/L. En adultos del pez cebra (*Danio rerio*), una de las especies más utilizadas en ensayos toxicológicos, Domingues *et al.* (2016) estudiaron los efectos causados

por la exposición crónica a IVM en un rango de concentraciones de 0,25 a 25,0 µg/L. Si bien el CL₅₀ de 96 horas observado por los autores fue considerablemente elevado (73,3 mg/L), los efectos comportamentales se observaron incluso en la menor concentración ensayada: los peces pasaron más tiempo en el estrato inferior del acuario comparado con los controles. Este comportamiento tuvo un impacto negativo en la alimentación, evidenciado por la pérdida de peso (principalmente en los machos). En las mayores concentraciones ensayadas los efectos observados fueron el letargo, reducción de la actividad natatoria, oscurecimiento de la piel y curvatura en la espina dorsal.

Escenario ambiental: la ganadería de islas

En Argentina, la expansión de la frontera agrícola y la intensificación de la agricultura, especialmente el cultivo de soja, han generado una relocalización de gran parte de la actividad ganadera (PROSAP, 2009). Esta situación es de particular relevancia en la cuenca del río Paraná.

Inicialmente, y hasta hace unas pocas décadas atrás, la región estuvo caracterizada por una modalidad ganadera denominada “ganadería de islas”, la cual era extensiva, involucraba una relativamente baja carga animal y tenía un marcado carácter estacional, ya que durante los meses cálidos (veranada), coincidente con el período de aguas bajas, los animales eran introducidos en las islas para su engorde con la vegetación nativa, retirándolos de las mismas y llevándolos hacia establecimientos cercanos ubicados en el continente en otoño. Esto último era realizado fundamentalmente por los productores ganaderos de la ribera entrerriana. Asimismo, no se realizaban prácticas de manejo particulares con los animales mientras estos pastaban libremente en las islas (Taller Ecologista, 2010). Cabe destacar que tanto ésta como el resto de las actividades productivas realizadas en el Delta estaban ligadas a la dinámica hidrológica del sistema que incluye crecientes tanto normales como extraordinarias, como las ocurridas durante el fenómeno climático de “El Niño” (Quintana *et al.*, 2014).

Como consecuencia de la expansión agrícola, la ganadería que tradicionalmente se desarrollaba en suelos productivos, fue desplazada a los humedales que forman parte de las planicies de inundación de los ríos de la Cuenca del Plata (figura 4) (PROSAP, 2009). Es así como una importante parte del stock ganadero fue desplazado hacia zonas de humedales como la región del Delta del Paraná, particularmente sus porciones media y superior. Estos humedales tienen la ventaja, con respecto a otras regiones del país en donde también se produjo un avance de la ganadería, de poseer extensas superficies de pastizales con una alta productividad natural que constituyen una importante fuente de forraje (Magnano *et al.*, 2013) para los diferentes sistemas ganaderos de producción de carne que se desarrollan en la región (Rossi, 2010).

Además, en gran parte de su territorio, el Delta ofrece también agua de buena calidad para el ganado (Quintana *et al.*, 2014).



Figura 4- Vista de los campos ganaderos en las islas del Delta del Paraná. (Foto: Rubén D. Quintana, editado de Quintana *et al.*, 2014).

La situación anteriormente descrita dio como resultado un incremento notable en el número de cabezas de ganado presentes en las islas, pasando de unas 160.000 a 1.500.000 entre 1997 y 2007 (Quintana *et al.* 2014), tendencia que en aumento actualmente (Massa *et al.*, 2021). Los datos para el departamento de Victoria, uno de los más importantes desde el punto de vista ganadero de la región, muestran claramente este proceso expansivo entre 2002 y 2009 ya que el stock de cabezas de ganado se incrementó en un 500%, pasando de 45.000 a 235.000 cabezas (datos para el total del departamento). En cuanto a la incidencia de este proceso sobre las islas, la relación entre el número de cabezas presentes en su porción insular respecto del total aumentó entre un 30% y un 80% (Taller Ecologista, 2010), mostrando claramente el proceso de desplazamiento de la hacienda a los humedales anteriormente descripto.

De esta manera los grandes humedales fluviales de la región del Delta del Paraná han sido escenario de un importante cambio en la modalidad productiva pecuaria que incluyó, por una parte, un notable incremento de la carga ganadera (aumento de la densidad de animales por hectárea), y por otra, el paso de un sistema de ganadería extensiva estacional a uno de tipo intensivo y permanente, como consecuencia de la elevada productividad natural (forraje) de estos ambientes (Kandus *et al.*, 2010; Massa *et al.*, 2021).

Es así como, para mejorar la eficiencia en el uso de los recursos de pastoreo, los ganaderos locales han implementado una serie de prácticas nuevas que incluyen el ya mencionado incremento de la carga ganadera, la planificación del pastoreo rotativo y la

inyección sistemática y frecuente del ganado con IVM (Bulman, 2013; Mesa *et al.*, 2020). Esta última práctica, en ausencia de una prescripción veterinaria adecuada, seguida del ingreso inmediato de los animales en el humedal luego del tratamiento con IVM, ha generado una gran preocupación acerca de la presencia de este fármaco en los ambientes de llanura de inundación de la Cuenca del Plata (Mesa *et al.*, 2020).

En particular los ambientes de llanura de inundación de los ríos Paraná y Uruguay, constituyen áreas de cría donde las larvas de peces migratorios y residentes encuentran “alimento y refugio” (Agostinho *et al.*, 2003; Fuentes, 1998). En estas áreas los individuos que colonizan los ambientes marginales producto de las inundaciones conviven con la intensa actividad ganadera (Quintana *et al.*, 2014), por lo que estarían expuestos a un sin fin de fármacos de uso veterinario, entre ellos la IVM. En este escenario, el éxito del reclutamiento de los peces que colonizan estos ambientes durante la deriva o desplazamiento de sus estadios tempranos de desarrollo podría verse afectado. No obstante, hasta la fecha no existen reportes sobre el impacto directo o indirecto de la ivermectina en la abundancia, supervivencia o en la ecología de los peces en humedales sudamericanos.

Especie clave en el ecosistema: el sábalo

El sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Figura 5), es un pez caraciforme (Figura 6) migratorio presente en numerosos ríos sudamericanos: Paraná, Uruguay, Río de la Plata, Paraguay, Pilcomayo, Bermejo y varios ríos de Brasil (Sverlij *et al.*, 1993).



Figura 5- Sábalo *Prochilodus lineatus* adulto (Foto: Laurent Guerinaud - <http://www.lgphotography.fr>).

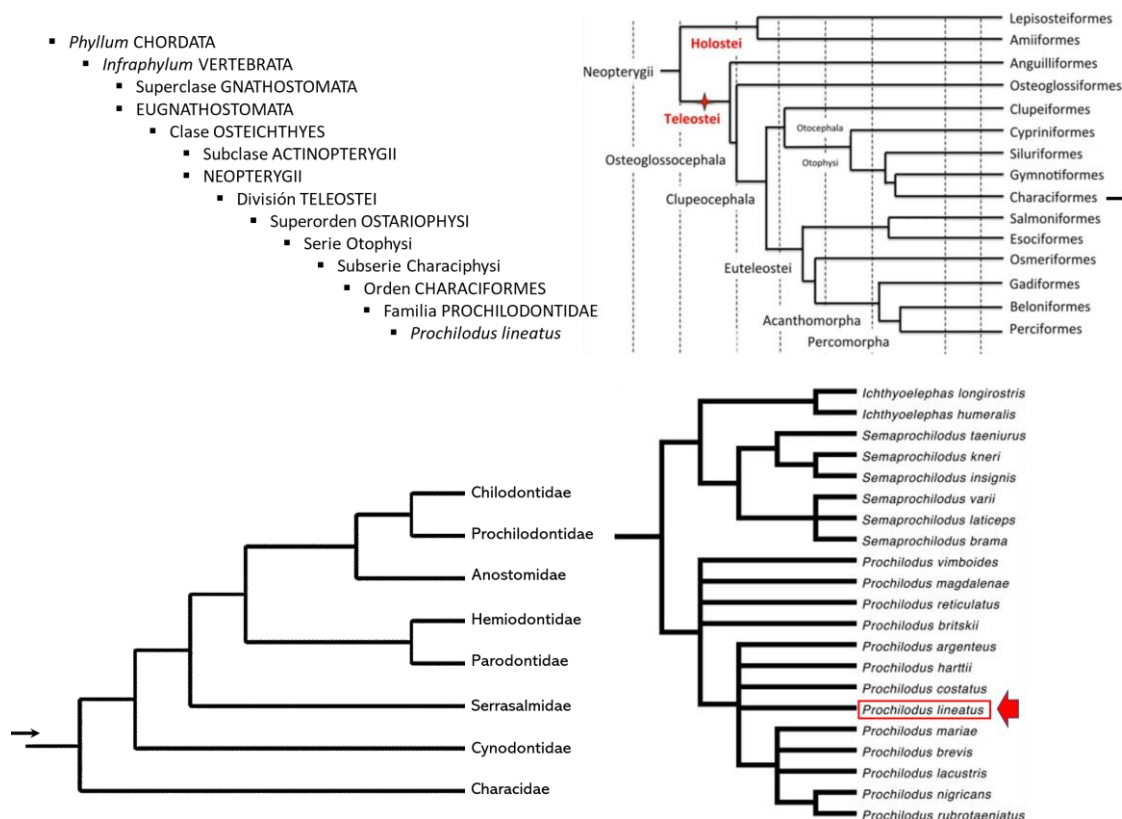


Figura 6- Posición taxonómica y filogenia del sábalo *Prochilodus lineatus* (modificado de Castro y Vary, 2004; Javonillo *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2016; Nelson *et al.*, 2016; Pasquier *et al.*, 2016).

En los ríos Uruguay y Paraná *P. lineatus* presenta adaptaciones que optimizan el éxito reproductivo mediante la utilización de áreas para el desove, la cría y la alimentación; entre las que se desplazan por migración activa (adultos) y por deriva a favor de la corriente (huevos y larvas). La zona de reproducción se encuentra normalmente en río abierto, aguas arriba de las áreas de cría y de alimentación en la planicie de inundación. La estrategia reproductiva de estas especies involucra, precisamente, la liberación de gran cantidad de huevos en aguas abiertas, en general sincronizada por el pulso de inundación del río y la utilización de la corriente y el desborde a los cuerpos de agua marginales (que constituyen las principales áreas de cría por sus condiciones de protección y disponibilidad de alimento) como mecanismos de dispersión de los huevos y larvas (Figura 7) (Fuentes *et al.*, 2016; Fuentes, 1998; Agostinho *et al.*, 1993). La dinámica poblacional del sábalo en este ambiente será discutida en mayor profundidad en el capítulo 3 de la presente tesis.

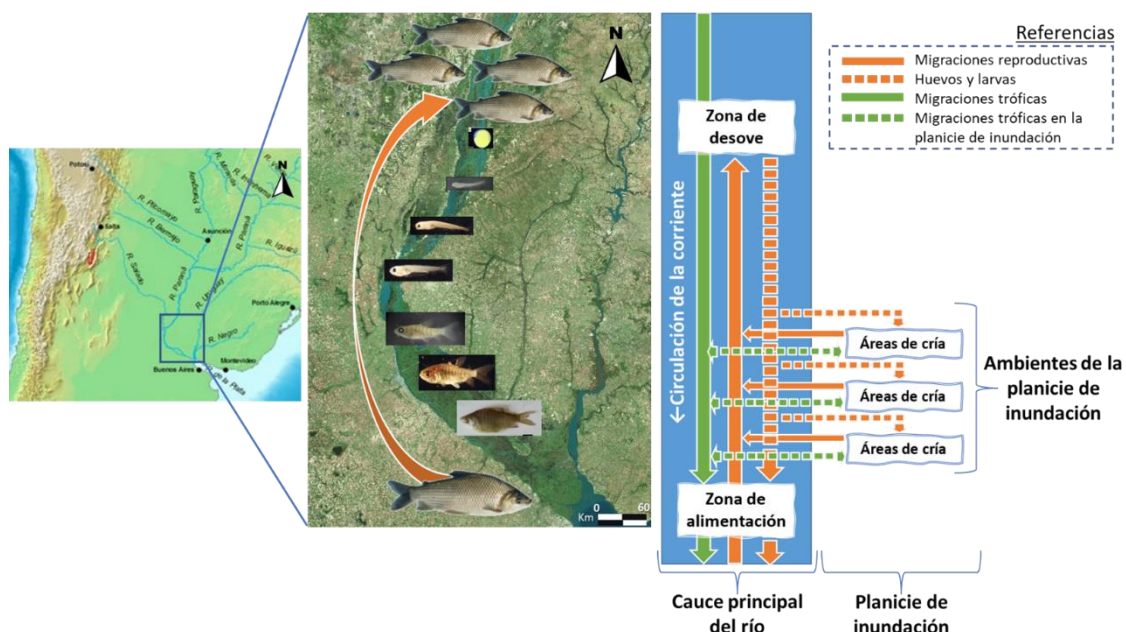


Figura 7- Esquema generalizado de los movimientos de larvas, juveniles y adultos de *Prochilodus lineatus*, entre las áreas de reproducción, alimentación y cría (adaptada de Bonetto *et al.*, 1981 y Fuentes, 1998).

De acuerdo con Sverlij *et al.* (1993), *P. lineatus* representaba, hasta inicios de la década del '90, un 40%, 86% y 95% del total de las capturas comerciales en los ríos Paraná, Río de la Plata y Uruguay, respectivamente. El sábalo es el recurso íctico más abundante de la bajauenca del Plata constituyendo más del 60% de la ictiomasa (Bonetto, 1944), se utiliza para consumo, comercio interno y exportación (Cappato y Yanosky, 2009). Como consecuencia de sus hábitos de alimentación -detritívoro estricto- y sus grandes poblaciones, *P. lineatus* juega un rol clave en el flujo de energía de los sistemas acuáticos neotropicales donde habita (Winemiller 1996), es funcionalmente dominante en algunos ecosistemas acuáticos (Welcomme, 1985; Flecker 1996) y al ser iliófago, es fundamental en el proceso de transformación de la materia orgánica, incorporando los contaminantes que se presentan no sólo en la columna de agua, sino también asociados a las partículas de sedimento (Lombardi *et al.*, 2010).

Los hábitos tróficos detritívoros del sábalo, sumado al uso de la planicie de inundación como áreas de cría durante su ciclo reproductivo, exponen a esta especie a las potenciales consecuencias ambientales de la intensa actividad ganadera en las islas de la baja Cuenca del Plata.

Bibliografía

Agostinho, A., Vazzoler, A. E. M., Gomez, L.C., Okada, E.K. (1993). Estratificación espacial y comportamiento de *Prochilodus scrofa* em distintas fases del ciclo de vida, en la planicie de inundación del alto río Paraná y embalse de Itaipu, Paraná, Brasil. *Revue D'Hydrobiologie Tropicale* 26: 79-90.

Agostinho, A., Gomes, L., Suzuki, H., Júlio Jr, H., Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (2003). En: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C. y Baer, A. (Ed.) *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust, the World Bank and the International Development Research Centre, Victoria, p. 19-99.

Alonso, Á., De Lange, H. J., Peeters, E. T. H. M. (2009). Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. *Ecotoxicology*, 19(1), 133. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0398-y>

Alves, C. M. G., Nogueira, J. N., Barriga, I. B., dos Santos, J. R., Santos, G. G., Tavares-Dias, M. (2019). Albendazole, levamisole and ivermectin are effective against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalminidae). *Journal of Fish Diseases*, 42(3), 405-412. <https://doi.org/10.1111/jfd.12952>

Beynon, S. A., Wainweight, W. A., Christie, M. (2015). The application of an ecosystem services framework to estimate the economic value of dung beetles to the U.K. cattle industry. *Ecological Entomology*, 40(S1), 124-135. <https://doi.org/10.1111/een.12240>

Benz, G. W., Roncalli, R. A., Gross, S. J. (1989). Use of Ivermectin in Cattle, Sheep, Goats, and Swine. Ivermectin and Abamectin. W. C. Campbell. New York, NY, Springer New York: 215-229.

Bloom, R. A., Matheson, J. C. (1993). Environmental assessment of avermectins by the US food and drug administration. *Veterinary Parasitology*, 48(1), 281-294. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90163-H](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90163-H)

Bonetto, A. A., Cannon Verón M. y Roldán D. (1981). Nuevos aportes al conocimiento de las migraciones de peces en el río Paraná. *Ecosur*, 8: 29-40.

Bonetto, A. A. (1994). Austral Rivers of South America. En: *Limnology Now: A Paradigm of Planetary Problems* (ed.: R. Margalef), pp. 425-472. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands.

Bravo, S., Pozo, V., Silva, M. T. (2015). Assessment of the freshwater treatment to control the sea lice *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(2): 322-328. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue2-fulltext-8>

Bulman, M. G. (2013). Desarrollo de la Ivermectina en Argentina y países vecinos: el antiparasitario completo que hizo huella y marcó una era. Parte II: 1992 – 2011. *Revista Veterinaria Argentina*, 30(301).

Caly, L., Druce, J. D., Catton, M. G., Jans, D. A., Wagstaff, K. M. (2020). The FDA-approved Drug Ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Research*, 104787. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104787>

Campbell, W. (1989). Ivermectin and Abamectin (Campbell, WC ed.). New York: Springer-Verlag.

Cappato, J., Yanosky, A. (2009). Uso sostenible de peces en la Cuenca del Plata. Evaluación subregional del estado de amenaza, Argentina y Paraguay.

Castro, R., Vari, R. P. (2004). Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study.

Chiu, S. H. L., Sestokas, E., Taub, R., Green, M. L., Baylis, F. P., Jacob, T. A., Lu, A. Y. H. (1990). Metabolic disposition of ivermectin in swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(11), 2079-2085. <https://doi.org/10.1021/jf00101a016>

Costello, M. (2009). The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of Fish Diseases*, 32(1), 115.

Daoud, D., McCarthy, A., Dubetz, C., Barker, D. E. (2018). The effects of emamectin benzoate or ivermectin spiked sediment on juvenile American lobsters (*Homarus americanus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 636-645. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.075>

Domingues, I., Oliveira, R., Soares, A. M. V. M., Amorim, M. J. B. (2016). Effects of ivermectin on *Danio rerio*: a multiple endpoint approach: behaviour, weight and subcellular markers. *Ecotoxicology*, 25(3), 491-499. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1607-5>

Dybas, R.A. (1989). Abamectin use in crop protection. In Campbell WC, editor. *Ivermectin and abamectin*. New York (NY): Springer-Verlag. p 287–310.

Egeler, P., Gilberg, D., Fink, G., Duis, K. (2010). Chronic toxicity of ivermectin to the benthic invertebrates *Chironomus riparius* and *Lumbriculus variegatus*. *Journal of Soils and Sediments*, 10(3), 368-376. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0197-3>

Eichberg, C., Wohde, M., Müller, K., Rausch, A., Scherrmann, C., Scheuren, T., Düring, R.-A., Donath, T. W. (2016). The Anthelmintic Ingredient Moxidectin Negatively Affects Seed Germination of Three Temperate Grassland Species. *PLoS ONE*, 11(11), e0166366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166366>

European Commission. (2010). Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal European Union*, 15(2377), 1-72.

European Medicines Agency. (2014). European public MRL assessment report (EPMAR) Ivermectin (All mammalian food producing species). https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/ivermectin-all-mammalian-food-producing-species-european-public-maximum-residue-limit-assessment_en.pdf

Flecker, A. S. (1996). Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology* 77,1845-1854.

Floate, K. D., Wardhaugh, K. G., Boxall, A. B. A., Sherratt, T. N. (2005). Fecal residues of veterinary parasiticides: Nontarget Effects in the Pasture Environment. *Annual Review of Entomology*, 50(1), 153-179. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130341>

Fuentes, C.M. (1998). Deriva de Larvas de Sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) y Otras Especies de Peces de Interés Comercial en el Río Paraná Inferior (Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires).

Fuentes, C. M., Gómez, M. I., Brown, D. R., Arcelus, A., Espinach Ros, A. (2016). Downstream Passage of Fish Larvae at the Salto Grande Dam on the Uruguay River. *River Research and Applications*, 32(9), 1879-1889. <https://doi.org/10.1002/rra.3030>

Garric, J., Vollat, B., Duis, K., Péry, A., Junker, T., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T. A. (2007). Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga

Pseudokirchneriella subcapitata. Chemosphere, 69(6), 903-910.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.070>

Gupta, D., Sahoo, A. K., Singh, A. (2020). Ivermectin: potential candidate for the treatment of Covid 19. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 24(4), 369-371.

Halley, B. A., Nessel R. J., Lu, A. Y. H. (1989a). Environmental Aspects of Ivermectin Usage in Livestock: General Considerations. Ivermectin and Abamectin. W. C. Campbell. New York, NY, Springer New York: 162-172.

Halley, B. A., Jacob, T. A., Lu, A. Y. H. (1989b). The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate. Chemosphere 18:1543–1563.

Hemaprasanth, K. P., Kar, B., Garnayak, S. K., Mohanty, J., Jena, J. K., Sahoo, P. K. (2012). Efficacy of two avermectins, doramectin and ivermectin against *Argulus siamensis* infestation in Indian major carp, *Labeo rohita*. Veterinary Parasitology, 190(1), 297-304.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.010>

Hennessy, D.R., Alvinerie, M.R. (2002). Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms. In: Vercruysse J, Rew RS (eds) Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy. CABI Publishing, New York, pp 97– 124.

Horsberg, T. E. (2012). Avermectin Use in Aquaculture. Current Pharmaceutical Biotechnology, 13(6), 1095-1102. <https://doi.org/10.2174/138920112800399158>

Høy, T., Horsberg, T. E., Nafstad, I. (1990). The Disposition of Ivermectin in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Pharmacology & Toxicology, 67(4), 307-312.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1990.tb00835.x>

Javonillo, R., Malabarba, L. R., Weitzman, S. H., Burns, J. R. (2010). Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 54(2), 498-511.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.08.026>

Johnson, S. C., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z., Hwang, J., Ho, J., Shih, C. (2004). A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. Zoological studies, 43(2), 229-243.

Junquera, P. (2015). Ivermectina: ficha toxicológica para uso veterinario en el ganado, caballos, perros y gatos: intoxicación, envenenamiento, sobredosis, síntomas, tolerancia, margen de seguridad, antídoto. En: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=1918&Itemid=2486

Kandus, P., Morandeira, N., Schivo, F. (2010). Bienes y Servicios Ecosistémicos de los Humedales del Delta del Paraná. Fundación Humedales / Wetlands International. Buenos Aires, Argentina.

Katharios, P., Pavlidis, M., Iliopoulou-Georgudaki, J. (2004). Accumulation of ivermectin in the brain of sea bream, *Sparus aurata* after intraperitoneal administration. Environmental Toxicology and Pharmacology, 17(1), 9-12. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.01.003>

Kövecses, J., Marcogliese, D. (2005). Avermectins, Potential Environmental Risks and Impacts on Freshwater Ecosystems in Québec: [Montréal]: Environment Canada, St. Lawrence Centre.

Krogh, K.A., Sjøeborg, T., Brodin, B., Halling-Sørensen, B. (2008). Sorption and mobility of ivermectin in different soils. *Journal of Environmental Quality* 37:2202–2211.

Krolewiecki, A., Lifschitz, A., Moragas, M., Travacio, M., Valentini, R., Alonso, D. F., Solari, R., Tinelli, M. A., Cimino, R. O., Álvarez, L., Fleitas, P. E., Ceballos, L., Golemba, M., Fernández, F., Fernández de Oliveira, D., Astudillo, G., Baeck, I., Farina, J., Cardama, G. A., Mangano, A., Spitzer, E., Gold, S., Lanusse, C. (2021). Antiviral effect of high-dose ivermectin in adults with COVID-19: A proof-of-concept randomized trial. *EClinicalMedicine*, 37, 100959. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100959>

Laing, R., Gillan, V., Devaney, E. (2017). Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends in Parasitology*, 33(6), 463-472. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.004>

Liebig, M., Fernandez, Á. A., Blübaum-Gronau, E., Boxall, A., Brinke, M., Carbonell, G., Egeler, P., Fenner, K., Fernandez, C., Fink, G., Garric, J., Halling-Sørensen, B., Knacker, T., Krogh, K. A., Küster, A., Löffler, D., Cots, M. Á. P., Pope, L., Prasse, C., Römbke, J., Rönnefahrt, I., Schneider, M. K., Schweitzer, N., Tarazona, J. V., Ternes, T. A., Traunspurger, W., Wehrhan, A., Duis, K. (2010). Environmental risk assessment of ivermectin: A case study. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6(S1), 567-587. <https://doi.org/10.1002/ieam.96>

Lindley, D. (1987). Merck's new drug free to WHO for river blindness programme. *Nature* 329:752.

Lombardi, P. E., Peri, S. I., Guerrero, N. R. V. (2010). Trace metal levels in *Prochilodus lineatus* collected from the La Plata River, Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 160 (1-4), 47-59.

Magnano, A. L., Vicari, R. L., Astrada, E. N., Quintana, R. D. (2013). Ganadería en humedales: Respuestas de la vegetación a la exclusión del pastoreo en tres tipos de ambientes en un paisaje del Delta del Paraná. *Revista de la Asociación Argentina de Ecología de Paisajes*, 5, 137-148.

Mancini, L., Lacchetti, I., Chiudioni, F., Cristiano, W., Di Domenico, K., Marcheggiani, S., Carere, M., Bindi, L., Borrello, S. (2020). Need for a sustainable use of medicinal products: the impacts on the environment of ivermectin. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 56(4), 492-496.

Martínez M, I., Lumaret, J.-P., Ortiz Zayas, R., Kadiri, N. (2017). The effects of sublethal and lethal doses of ivermectin on the reproductive physiology and larval development of the dung beetle *Euoniticellus intermedius* (Coleoptera: Scarabaeidae). *The Canadian Entomologist*, 149(4), 461-472. <https://doi.org/10.4039/tce.2017.11>

Massa, E., Carrel, N., Visintini, M. L. (2021). Ganadería de islas: cambios del rodeo bovino en la planicie de inundación del río Paraná, Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal*, 41(1), 19-25.

Mega, E. R. (2020). Latin America's embrace of an unproven COVID treatment is hindering drug trials. *Nature*, 586(7830), 481-483.

Melo, B. F., Sidlauskas, B. L., Hoekzema, K., Frable, B. W., Vari, R. P., Oliveira, C. (2016). Molecular phylogenetics of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 102, 189-201. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.05.037>

Mesa, L., Gutiérrez, M. F., Montalto, L., Perez, V., Lifschitz, A. (2020). Concentration and environmental fate of ivermectin in floodplain wetlands: An ecosystem approach. *Science of The Total Environment*, 135692. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135692>

Ministerio de Salud, Gobierno del Estado de Bolivia. Resolución ministerial No. 0259. 2020. <https://www.minsalud.gob.bo/component/jdownloads/?task=download.send&id=425&catid=27&m=0&Itemid=646>

Ministerio de Salud, República del Perú. Resolución ministerial No. 270-2020-MINSA. 2020. https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/694719/RM_270-2020-MINSA.PDF

Nelson, J. S., Grande, T. C., Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.

Ōmura, S. (2008). Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(2), 91-98. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.08.023>

Palmer, R., Rodger, H., Drinan, E., Dwyer, C., Smith, P. R. (1987). Preliminary trials on the efficacy of ivermectin against parasitic copepods of Atlantic salmon. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 7(2), 48.

Pasquier, J., Cabau, C., Nguyen, T., Jouanno, E., Severac, D., Braasch, I., Journot, L., Pontarotti, P., Klopp, C., Postlethwait, J. H., Guiguen, Y., Bobe, J. (2016). Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics*, 17(1), 368. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2709-z>

Popp, M., Stegemann, M., Metzendorf, M. I., Gould, S., Kranke, P., Meybohm, P., Skoetz, N., Weibel, S. (2021). Ivermectin for preventing and treating COVID-19. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (7). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD015017.pub2>

PROSAP. (2009). *Estrategia Provincial Para el Sector Agroalimentario*. Provincia de Entre Ríos. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación.

Quintana, R.D., Bó, R.F., Astrada, E., Reeves, C. (2014). *Lineamientos para una ganadería ambientalmente sustentable en el Delta del Paraná*. Fundación para la Conservación y el Uso Sustentable de los Humedales, Argentina, Buenos Aires.

Rehman, M. S. U., Rashid, N., Ashfaq, M., Saif, A., Ahmad, N., Han, J.I. (2015). Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries. *Chemosphere*, 138, 1045-1055. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.036>

Rossi, C.A. (2010). Forraje para la ganadería. En Kandus, P., N. Morandeira y F. Schivo (Eds.): *Bienes y Servicios Ecosistémicos de los Humedales del Delta del Paraná*. Fundación Humedales / Wetlands International. Buenos Aires, Argentina.

Sanderson, H., Laird, B., Pope, L., Brain, R., Wilson, C., Johnson, D., Bryning, G., Peregrine, A. S., Boxall, A., Solomon, K. (2007). Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms. *Aquatic Toxicology*, 85(4), 229-240. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.08.011>

Sauvé, S., Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1-7. doi: 10.1186/1752-153x-8-15

Schmith, V. D., Zhou, J., Lohmer, L. R. L. (2020). The Approved Dose of Ivermectin Alone is not the Ideal Dose for the Treatment of COVID-19. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 108(4), 762-765. <https://doi.org/10.1002/cpt.1889>

Sharun, K., Dhama, K., Patel, S. K., Pathak, M., Tiwari, R., Singh, B. R., Sah, R., Bonilla-Aldana, D. K., Rodriguez-Morales, A. J., Leblebicioglu, H. (2020). Ivermectin, a new candidate therapeutic against SARS-CoV-2/COVID-19. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00368-w>

Sosa, N., Orcellet, J. M., Gambaudo, S. (2016). Uso agronómico de residuos orgánicos de origen animal. *Informaciones agronómicas de Hispanoamérica*, (23), 14-18.

Sverlij S.B., Ros A.E., Orti G. (1993). Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847). Sinopsis sobre la pesca 154. FAO, Roma, Italia.

Taller Ecologista. (2010). Humedales del Paraná. Biodiversidad, usos y amenazas en el Delta Medio. Programa de subvenciones para Ecosistemas (EGP) del Comité Holandés para la IUCN NL. Inercia Comunicaciones, Rosario, Santa Fe. 66 pp.

Ubacht, N., Teira, M. R., Boixadera, J. (2005). Labores de incorporación de abonos orgánicos al suelo. Distintos subproductos orgánicos, maquinaria para su distribución y planificación de la aplicación. *Vida Rural*, p. 32-3

Ucán-Marín, F., Ernst, W., O'Dor, R. K., Sherry, J. (2012). Effects of food borne ivermectin on juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Survival, growth, behavior, and physiology. *Aquaculture*, 334–337, 169-175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.036>

Vallejos, J., Zoni, R., Bangher, M., Villamandos, S., Bobadilla, A., Plano, F., Campias, C., Chaparro Campias, E., Medina, M. F., Achinelli, F., Guglielmone, H. A., Ojeda, J., Farizano Salazar, D., Andino, G., Kawerin, P., Dellamea, S., Aquino, A. C., Flores, V., Martemucci, C. N., Martinez, S. M., Segovia, J. E., Reynoso, P. I., Sosa, N. C., Robledo, M. E., Guarrochena, J. M., Vernengo, M. M., Ruiz Diaz, N., Meza, E., Aguirre, M. G. (2021). Ivermectin to prevent hospitalizations in patients with COVID-19 (IVERCOR-COVID19) a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 635. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06348-5>

Vokřál, I., Michaela, Š., Radka, P., Jiří, L., Lukáš, P., Dominika, S., Kateřina, L., Barbora, S., Lenka, S. (2019). Ivermectin environmental impact: Excretion profile in sheep and phytotoxic effect in *Sinapis alba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 944-949. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.097>

Wall, R., Strong, L. (1987). Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature*, 327(6121), 418-421. <https://doi.org/10.1038/327418a0>

Wang, D., Han, B., Li, S., Cao, Y., Du, X., Lu, T. (2019). Environmental fate of the anti-parasitic ivermectin in an aquatic micro-ecological system after a single oral administration. *PeerJ*, 7, e7805.

Wang, D., Han, B., Li, S., Du, X., Cao, Y., Lu, T. (2020). Assessment of the fate and effect of ivermectin in a simulated aquaculture ecosystem. *Aquaculture Research*, 51(2), 535-541. <https://doi.org/10.1111/are.14398>

Welcomme, R.L. (1985). River Fisheries. Technical Paper 262. FAO, Roma, Italia.

Winemiller, K.O. (1996). Factors driving spatial and temporal variation in aquatic floodplain food webs. En: *FoodWebs: Integration of Patterns and Dynamics* (eds. G.P. Polis y K.O. Winemiller), pp. 298-312. Chapman and Hall, New York, NY, USA.

Wolstenholme, A. J., Rogers, A. T. (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131(S1), S85-S95. <https://doi.org/10.1017/S003118200500821>

Hipótesis y objetivos

Hipótesis de trabajo

- Se detecta ivermectina en los compartimentos ambientales: agua, sedimento y peces provenientes de la planicie de inundación de la Baja Cuenca del Río Paraná.
- La exposición a concentraciones ambientales de ivermectina en juveniles de sábalo produce efectos a nivel bioquímico, fisiológico y en el comportamiento natatorio.
- La presencia de ivermectina en las lagunas de la planicie de inundación de la cuenca del río Paraná afecta la dinámica de reclutamiento del sábalo.

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral es abordar de forma novedosa e interdisciplinaria la problemática ambiental del uso masivo del antiparasitario ivermectina (IVM) focalizándose en el impacto sobre una especie ictícola de gran importancia económica en Sudamérica, utilizando un enfoque fisiológico, comportamental y ecológico.

Para ello se estudiarán, en laboratorio y en ambiente, los efectos del antiparasitario ivermectina (principio activo) en juveniles del sábalo *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae).

Objetivos específicos

En el ambiente

- 1) Cuantificar los niveles de ivermectina presentes en muestras de agua y sedimentos de las lagunas localizadas en la baja Cuenca del Río Paraná.
- 2) Determinar los niveles de ivermectina presentes en ejemplares juveniles provenientes de las lagunas en estudio.
- 3) Analizar de forma integral el impacto de la IVM sobre la dinámica de reclutamiento de juveniles en las lagunas localizadas en la baja Cuenca del Río Paraná.

En el laboratorio

- 4) Establecer el valor de toxicidad letal aguda de la ivermectina (principio activo) en postlarvas/juveniles de sábalo.
- 5) Evaluar los efectos de la exposición subcrónica a IVM (principio activo) tanto en agua como en sedimentos sobre parámetros asociados a estrés oxidativo en ejemplares juveniles.
- 6) Determinar las alteraciones producidas por la exposición a IVM a nivel hematológico, inmunológico, neurológico e histológico en juveniles.
- 7) Estudiar el efecto de la exposición a IVM sobre el comportamiento de natación, alimentación y evasión en juveniles de sábalo.

Capítulo 1:

Niveles de ivermectina detectados en los compartimentos ambientales

El monitoreo ambiental

La realización del monitoreo ambiental para prever el desarrollo de posibles consecuencias toxicológicas críticas se ha hecho necesaria y, en ocasiones, obligatoria. De acuerdo con Mkandawire *et al.* (2013) hay tres razones principales para esto: 1) obtener información para la evaluación de riesgo y la gestión ambiental, 2) para cumplir con los requisitos legales para el desarrollo y la liberación de productos químicos en el ambiente, y 3) para desarrollar principios empíricos o teóricos para mejorar el conocimiento del comportamiento y los efectos de los productos químicos en los sistemas vivos.

Presencia de fármacos para uso veterinario en el ambiente

El riesgo potencial de los fármacos de uso veterinario (MV) en el ambiente suscitó preocupación mucho antes que los productos farmacéuticos para uso humano. Por ejemplo, el impacto de los parasiticidas en la supervivencia de los escarabajos peloteros se estudió hace más de 30 años (Blume *et al.*, 1976). En particular los endo y ectoparasiticidas suelen alcanzar más rápidamente los suelos al ser aplicados regularmente a los animales de pastoreo y ganado de cría intensiva.

Los MV pueden llegar al suelo a través de 3 vías de exposición principales: directamente a través de las heces, indirectamente a través del estiércol pisoteado y/o esparcido o mediante el lavado de productos aplicados tópicamente (Halling-Sørensen *et al.*, 1998). Los MV a menudo actúan como biocidas; es decir, actúan específicamente sobre organismos diana como bacterias o invertebrados (Boxall *et al.*, 2004). En este sentido, son muy similares a los plaguicidas y productos biocidas. Incluso hay ejemplos en los que se utiliza la misma sustancia activa para ambos fines, es decir, como plaguicida y de uso veterinario (p. ej., deltametrina). Por lo tanto, es probable que se produzcan consecuencias ambientales similares para los fármacos de uso veterinario y para los plaguicidas. Los organismos diana (p. ej., moscas azules o parásitos intestinales) y los organismos no blanco (p. ej., moscas del estiércol o nematodos saprófagos) pueden pertenecer, en más de una ocasión, a los mismos grupos taxonómicos (dípteros y nematodos respectivamente en este caso). Por lo tanto, es probable que este tipo de sustancias afectan no solo a los organismos blanco sino también a los organismos no blanco.

La ivermectina en el ambiente: usos en ganadería de islas en la planicie de inundación de la cuenca del Plata

Con más de 5 mil millones de dosis vendidas en todo el mundo desde su introducción en el mercado a principios de la década de 1980, la IVM se ha convertido en el fármaco

antiparasitario más utilizado (Shoop y Soll, 2002). Se usa regularmente como parasitocida para bovinos, cerdos, ovejas, caballos y perros (Campbell et al., 1983; Forbes, 1993). Las aplicaciones orales tienden a producir picos de excreción pronunciados, y la mayor parte de la dosis se excreta en unos pocos días (Halley et al., 1989). Los picos máximos de eliminación de las formulaciones tópicas o inyectables generalmente ocurren dentro de los 2 a 7 días posteriores al tratamiento, seguida de una liberación sostenida que puede mantenerse durante más de 4 a 6 semanas, mientras que los niveles máximos de eliminación de las formulaciones de liberación sostenida pueden ocurrir durante varias semanas posteriores al tratamiento (Floate et al., 2005).

La República Argentina, como país ganadero, no está exenta a esta problemática ya que, al día de la fecha, no existen estudios de riesgo ambiental ni regulaciones al respecto. En la actualidad en Argentina se presentan dos escenarios de potencial estrés ambiental asociados al uso de la IVM: por un lado, la creciente importancia que ha ganado la acuicultura continental en los últimos 20 años, principalmente dirigida al pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y a la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Huidobro, 2016) donde el uso de este tipo de antiparasitarios no se encuentra regulado y, por otro lado, la explotación semi intensiva de ganado en la zona de humedales de la Cuenca del Plata (Quintana et al., 2014), donde el uso de la IVM ha crecido significativamente desde el inicio de los 90's (Bulman, 2013). En Argentina, la intensificación de la agricultura, en particular del cultivo de soja, ha obligado a la reubicación del ganado hacia tierras de pastoreo más marginales, como los humedales de llanura aluvial (PROSAP, 2009; Mesa et al., 2020). Para ser eficientes en el uso de los recursos de pastoreo, los ganaderos locales han implementado una serie de prácticas nuevas, que incluyen la inyección sistemática y frecuente de IVM al ganado. Esta práctica, en ausencia de una prescripción veterinaria estricta, seguida del contacto del ganado con los humedales inmediatamente después de la aplicación, ha generado preocupación sobre la presencia y los efectos de IVM en estos ambientes de llanuras aluviales (Mesa et al., 2020).

Metodología

Área de estudio

El valle del Bajo Río Paraná, los cuerpos de agua asociados y el paisaje llano circundante a la planicie son fuertemente afectados por las fluctuaciones del régimen hidrológico del Paraná (Bonetto, 1975). A medida que aumenta la descarga del río durante la primavera y el verano y el nivel del agua supera los 3 m (Del Barco et al., 2012), los humedales y las cuencas poco profundas se inundan y los lagos dentro de las islas del valle adquieren plena conectividad.

El lago de planicie de inundación examinado en esta tesis (Isla El Espinillo-La Invernada) es un cuerpo de agua marginal ubicado en el Bajo Río Paraná, Argentina (S 32°55', O 60°37'). Situada en el margen izquierdo (este) del río Paraná, el área se caracteriza por amplias planicies de inundación, con islas y lagunas que tienen diferentes grados de conectividad con el río principal y los canales (Figura 8).

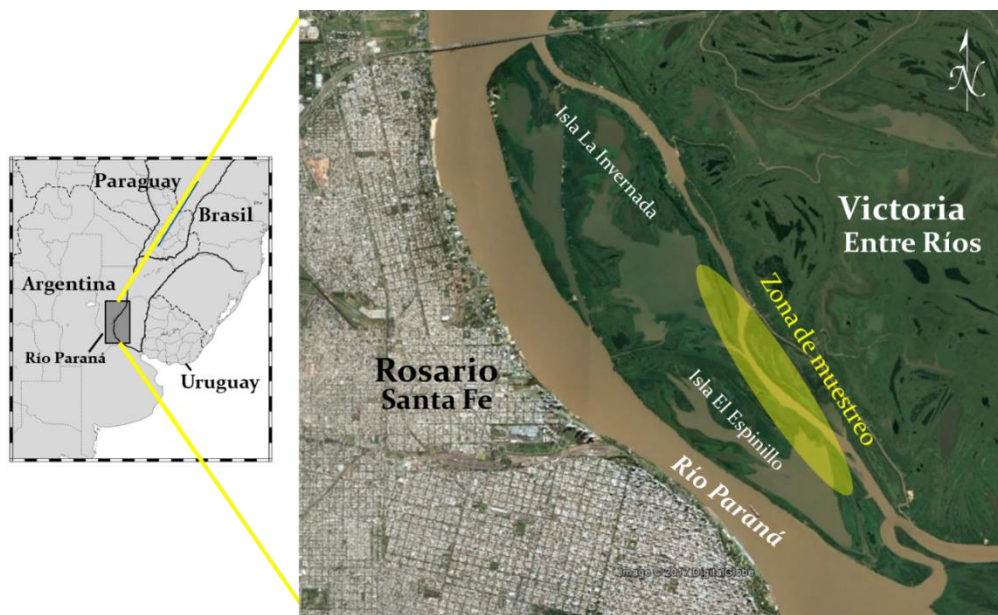


Figura 8- Ubicación de la zona de muestreo en la isla El Espinillo.

En las inmediaciones de la isla El Espinillo se encuentran registrados al menos 15 establecimientos productivos ganaderos (Chiummiento, 2022). Los animales son desplazados por las diferentes islas y cuerpos de agua o concentrados en corrales presentes en la isla (Figura 9).



Figura 9- Ganado pastando sobre el albardón de la isla El Espinillo (izquierda) y corral construido sobre la isla misma (derecha).

Estimación teórica de la concentración ambiental de ivermectina

Aunque las evaluaciones ambientales de los productos a base de IVM modelaron las entradas directas de IVM en estanques y ríos, las evaluaciones solo consideraron cuál sería la concentración final en la columna de agua, y no la concentración en los sedimentos (Kövecses y Marcogliese, 2005).

En este trabajo de investigación se consideró un escenario similar al descrito en la evaluación ambiental para la administración de IVM al ganado (vacas adultas en un estanque de un acre; FDAH 1997), estimando las concentraciones de IVM en los sedimentos como resultado de la defecación del ganado directamente en un cuerpo de agua.

Se estimó la concentración ambiental prevista (en la presente tesis como excepción se utilizará el anglicismo PEC, del inglés *Predicted environmental concentration*) de IVM en los primeros 5 cm de sedimento en el área circundante a la isla El Espinillo. Para esta estimación se utilizó la información disponible acerca del número total de animales registrados en las explotaciones ganaderas de la región (Chiummiento, 2022) y los censos de la vacunación de aftosa de SENASA (SENASA, 2022), la dosificación de IVM recomendada (0,2 mg/kg de animal) y el número de aplicaciones en un año. En los alrededores del sistema Isla El Espinillo-Isla La Invernada se encuentran registrados 15 establecimientos ganaderos, con un total de 2457 animales (Figura 10), con una densidad promedio de 37,4 animales/km².



Figura 10- Establecimientos ganaderos (puntos rojos) en las inmediaciones de la isla El Espinillo-La Invernada frente a las costas de Rosario. En la tabla a la derecha se presentan los distintos establecimientos incluyendo la superficie explotada declarada y el número de animales registrados.

Muestreo ambiental

El muestreo se llevó a cabo en 4 fechas diferentes que buscan representar distintas estaciones del año y diferentes escenarios hidrológicos (aguas bajas y aguas altas): enero de 2017, noviembre de 2018, mayo de 2019 y septiembre de 2019.

La ubicación de cada sitio de muestreo y su denominación se encuentran en la figura 11.



Figura 11- Ubicación de los sitios de muestreo sobre la isla El Espinillo y sus denominaciones.

El sitio denominado “El árbol” (Figura 12) se encuentra en la costa Oeste, sobre el albardón, del antiguo cauce del río Paraná denominado Paraná viejo. En esta zona es frecuente encontrar animales pastando sobre la vegetación flotante.



Figura 12- Sitio de muestreo denominado “El árbol”.

El sitio de muestreo denominado “Zanjón Acosta” (Figura 13) es un arroyo que proviene de la laguna principal dentro de la isla El Espinillo y desagua directamente sobre el antiguo cauce del río Paraná, en el brazo denominado actualmente como Paraná Viejo. Esta laguna interna es adyacente a un corral y fuente de agua de bebida para el ganado. La profundidad de la laguna oscila entre los 0,5 y 1,0 m de profundidad, mientras que el arroyo “Zanjón Acosta” puede superar los 2 m.



Figura 13- Sitio de muestreo “Zanjón Acosta” (izquierda) y laguna interna de la isla El Espinillo (derecha) donde puede apreciarse el corral de animales.

El sitio denominado “Paraná Viejo” (Figura 14) se encuentra localizado en la costa Este del viejo cauce del río Paraná, denominado Paraná Viejo.



Figura 14- Sitio de muestreo “Paraná Viejo”.

En cada sitio de muestreo se tomaron una serie de parámetros *in situ*: temperatura (°C), conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), sólidos totales disueltos (mg/L), pH, oxígeno disuelto (mg/L y %) (Figura 15).



Figura 15- Determinación en campo de parámetros *in situ*.

En línea con los objetivos del eje ambiental de esta tesis para la cuantificación de los niveles de ivermectina presentes en agua y sedimentos de las lagunas localizadas en la baja Cuenca del Río Paraná y para determinar los niveles de ivermectina presentes en juveniles provenientes de las lagunas en estudio, se diseñó, como se detalla a continuación, la toma de muestras sobre los diferentes compartimentos ambientales del sitio de muestreo.

Agua y sólidos en suspensión

Las muestras de agua superficial se recogieron en los primeros 50 cm de la columna de agua y se filtraron *in situ* a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ para discriminar entre fracción soluble y particulada (APHA, 1998). Se colectaron 200 ml de agua, obteniéndose dos muestras de 200 ml de agua filtrada por sitio en una botella de vidrio color caramelo, las cuales se acondicionaron mediante la adición de metanol hasta lograr 1% y 5 ml de Na_2EDTA al 5% p/v como agentes auxiliares antibacterianos y complejante de metales respectivamente (Ben et al., 2008; Tong et al., 2009): Posteriormente se mantuvieron en un

refrigerador a 4°C hasta su traslado al laboratorio. Las muestras se almacenaron luego a -20°C hasta el momento del procesamiento, según APHA (1998) y Kennedy et al. (1998).

Para la determinación del material particulado en suspensión (MPS), los filtros de membrana de nylon (0,45 µm) utilizados fueron previamente pesados. La filtración se llevó a cabo de manera manual con un portafiltro acoplado a una jeringa (Figura 16). Los filtros pre y post muestreo se secaron por al menos 24 horas en desecador, luego fueron pesados (hasta pesada constante) y por último conservados en frío hasta su análisis.



Figura 16- Sistema de filtración de agua con portafiltro con filtro de nylon y jeringa de 60 ml.

Sedimentos

Se tomaron muestras integradas de sedimentos (*pool* de 5 muestras por sitio) de fondo de los sitios indicados en la figura 11. Se colectaron los primeros 5 cm de sedimento de fondo con una cuchara plástica, los cuales se conservaron en bolsas plásticas posteriormente selladas y se mantuvieron a 4°C hasta su traslado al laboratorio. Pevio a su conservación en freezer hasta el análisis (-20°C), se homogeneizó cada muestra y se fraccionó una porción de 5 g (peso húmedo) para el análisis de humedad de la muestra. El resto de la muestra (50 g aprox.) se utilizó para la determinación analítica de IVM.

La determinación del porcentaje de humedad de los sedimentos se obtuvo por diferencia de pesada entre la masa a temperatura ambiente y la masa constante a 105°C.

Captura de juveniles

Los peces en etapa juvenil (menores a 10 cm de Long. Estándar) fueron capturados en horas diurnas en primavera y verano mediante el uso de redes de arrastre (10 metros de largo y 1 mm de apertura de malla) y redes de marco (1,6 mm de apertura de malla) (Figura 17). La elección de las fechas de muestreo de juveniles de sábalo obedece al ciclo de vida descrito para la especie (Lozano et al., 2019).



Figura 17- Maniobras de pesca con red de marco (izquierda) y red de arrastre (derecha).

Cuantificación de la ivermectina

Las metodologías y técnicas de extracción y cuantificación de IVM fueron optimizadas y llevadas a cabo en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA, CONICET-UNLP) bajo la coordinación del Dr. Damián Marino y su equipo.

Muestras de agua: extracción en fase sólida

Los procedimientos de análisis de residuos de IVM de muestras de agua filtrada se modificaron de Sanderson et al. (2007). Para el procedimiento de extracción en muestras de agua provenientes del ambiente o acuarios, se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) de reservorio Waters Oasis HLB 60 mg de 3 ml (Waters Corporation) y un colector de vacío Visiprep™ SPE de Supelco (Sigma-Aldrich Co.) (Figura 18).

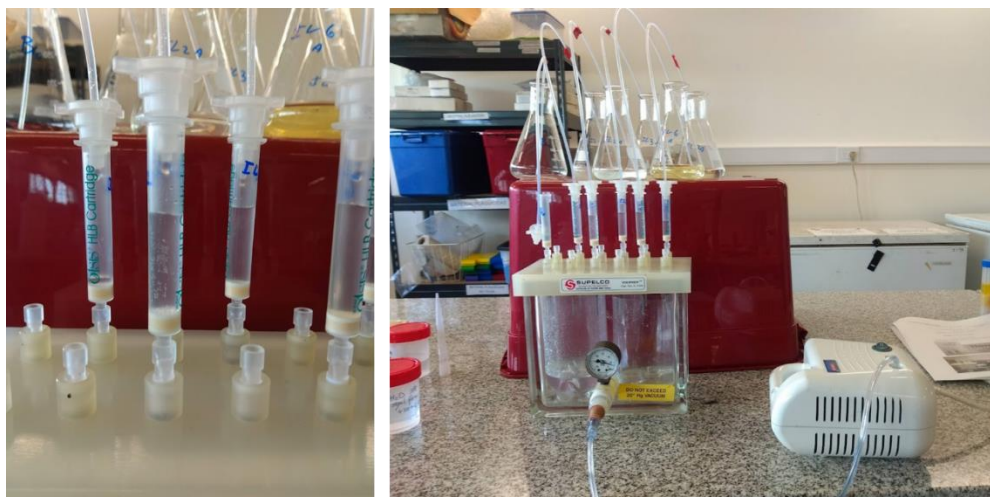


Figura 18-Sistema de SPE funcionando.

Las muestras estándar de trabajo (Wstd) se prepararon en agua control Nanopure mediante la adición de IVM disuelta en metanol hasta una concentración final de 20 µg/L. Las curvas de calibración consistieron en un blanco de agua Nanopure y muestras de agua Nanopure enriquecidas con concentraciones finales de IVM de 1,0, 10,0, 50,0 y 100,0 µg/L. Para cada muestra, se acondicionó un cartucho SPE con 3 ml de metanol seguido de 3 ml de agua Nanopure. Las muestras (100 ml) se transfirieron a los cartuchos activados y se eluyeron en vacío de 75 mm de Hg. Cada cartucho se lavó con 2 ml de agua Nanopure. Después del lavado, las muestras se eluyeron con 3 ml de metanol en tubos de ensayo limpios de vidrio de borosilicato de 10 ml. El eluyente se evaporó bajo una suave corriente de nitrógeno a 50°C en un baño de agua. Las muestras secas se resuspendieron con 0,5 ml de metanol y 0,5 ml de EDTA 5 mM, se filtraron con una membrana de nylon de 0,22 y se transfirieron a viales de HPLC de vidrio ámbar.

Material particulado en suspensión: método de sonicación y extracción

Para la extracción de IVM del MPS, los filtros de nylon se plegaron y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml que contenía 2 ml de metanol. Las muestras se sonicaron en un baño ultrasónico durante dos intervalos de 10 minutos, agitando a mano durante 1 minuto al final de cada sonicación (Figura 19). Después de la sonicación, cada tubo se centrifugó a 3000 RPM durante 5 minutos y se transfirieron 0,5 ml del sobrenadante a un vial de HPLC ámbar que contenía 0,5 ml de EDTA 5 mM.



Figura 19- Disposición de filtros en tubos para extracción.

Sedimentos: método multirresiduos QuEChERS

La extracción de IVM de los sedimentos se basó en una modificación del método multirresiduos (por sus siglas en inglés QuEChERS, *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) desarrollado por Anastassiades et al. (2003). Brevemente, se mezclaron 7 g de muestra de sedimentos húmedos con acetonitrilo (ACN) que contenía ácido acético al 1%. Después de 3 intervalos de agitación durante 1 minuto y sonicación durante 10 minutos, se añadieron 6 g de sulfato de magnesio y 2 g de acetato de sodio seguido de 1 minuto de agitación manual. Después de la sonicación, todas las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Se mezclaron 0,5 ml de sobrenadante con 0,5 ml de EDTA 5 mM, se filtraron usando viales de filtro (membrana de nylon; tamaño de poro de 0,22 μm) y se transfirieron a viales de HPLC de color ámbar (Figura 20). Blanco y Wstd (10 $\mu\text{g/L}$ de IVM) se realizaron con 7 ml de agua Nanopure en lugar de 7 g de sedimentos. Las curvas de calibración consistieron en un sobrenadante en blanco

enriquecido, obtenido de la extracción, con concentraciones finales de IVM de 1,0; 10,0; 50,0 y 100,0 µg/L.

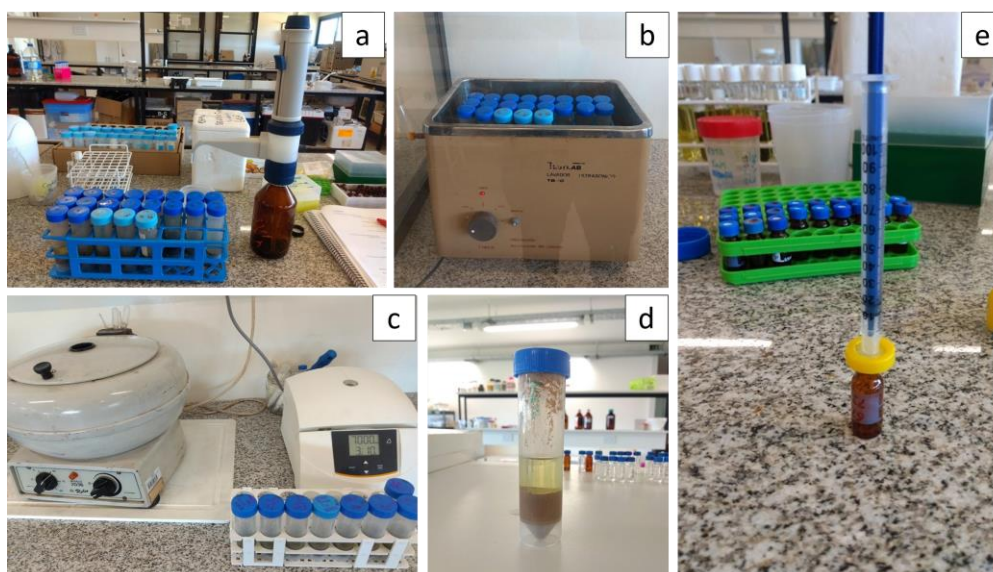


Figura 20- Políptico de los diferentes pasos para la extracción de IVM con la técnica de QuEChERS en los sedimentos. a: Colocación del ACN-1% HAC a cada tubo previo a la sonicación; b: sonicado de tubos; c: centrifugado de tubos post agregado de sales; d: extracto final luego de la centrifugación; e: filtrado de extractos y carga de viales.

Músculo de peces: método multirresiduos QuEChERS

Muestras de 1 g de músculo de peces fueron trituradas en un tubo Falcon al que luego se le agregó 2 ml de ácido fórmico y 0,2%, 2 ml ACN. Los tubos se sonicaron durante 15 minutos. Luego se adicionaron 0,4 g de acetato de sodio y 1,2 de MgSO_4 tras lo cual los tubos se agitaron manualmente durante 1 minuto. A continuación, las muestras se centrifugaron 5 minutos y la fase orgánica fue separada. A esta fase se le adicionó 150 mg de MgSO_4 y 50 mg de C_{18} en polvo. Se agitaron los tubos manualmente otro minuto y se centrifugaron nuevamente. Se recuperó el volumen de sobrenadante y se adicionó igual volumen de EDTA 5 mM. Se realizó una última centrifugación y el sobrenadante se transfirió a un vial cromatográfico.

Análisis cromatográfico e instrumental utilizado

Para la detección y cuantificación de IVM en todas las fases mencionadas previamente se utilizó un cromatógrafo de líquidos Waters® modelo Alliance 2695 (Waters, Milliford, MA), con fuente de ionización ESI acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo en tándem Quattro Premier XE™ (Waters, Milliford, MA) con un Xselect® CSHTM C18 Columna de 3,5 µm, 4,6 x 75 mm (Waters, Milliford, MA) (Figura 21). El componente A de la fase móvil era una mezcla de agua de grado HPLC, NH_4Ac 5 mM y ácido fórmico al 0,1%. El componente B de la fase móvil fue metanol de grado HPLC, NH_4Ac 5 mM y ácido fórmico al 0,1%. Durante la ejecución, el

gradiente aumentó del 100 % de la fase A al 50 % de la fase A más el 50 % de la fase B en 0,5 min, al 10 % de la fase A y al 90 % de la fase B después de 2 min y, finalmente, al 100 % de la fase B a 10,1 min a un caudal de 0,5 ml/min. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µL. La detección por espectrometría de masas se realizó en modo positivo con seguimiento de dos transiciones iónicas de $[M+NH_4]^+$, correspondientes a 892.5>307.3 (Q) y 892.5>569.3(q) (Durden, 2007). El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) fueron establecidos en 0,2 y 0,5 µg/L respectivamente.



Figura 21- Equipo cromatográfico utilizado.

Resultados

Concentración ambiental prevista de ivermectina (PEC)

Se consideró el escenario de mínima, donde cada uno de los animales habría sido tratado con IVM inyectable al menos con una dosis de 0,2 mg/kg (Halley et al., 1989) y entre un 45 y 90% de la dosis suministrada es eliminada de manera inalterada a través de las heces (Halley et al., 1989; Alvinerie et al., 1999). Si la IVM es eliminada de esta manera, cada animal de 400 kg eliminaría entre 36 y 72 mg de IVM en el ambiente por cada aplicación. Teniendo en cuenta el total de animales en la región, por cada aplicación se incorporan al ambiente estudiado entre 88452 y 176904 mg de IVM. Considerando la adsorción de la IVM a los primeros 5 cm de sedimentos, la PEC de la IVM es 0,0168 y 0,0337 µg IVM por kilogramo de sedimentos (Tabla 1).

Tabla 1- Estimación teórica de la concentración de ivermectina en sedimentos en el sistema isla El Espinillo-La Invernada.

Parámetro/supuesto	Valor
Peso promedio de un animal	400 kg
Si cada animal recibe una dosis de 0,2 mg IVM/kg* de peso total y defecan sobre el sistema Isla El Espinillo-Isla La Invernada:	
• Cantidad de IVM administrada a cada animal	80 mg
• Cantidad total de IVM administrada a todos los animales	2457 vacas x 80 mg = 196560 mg
• Cantidad de IVM eliminada a través de las heces por cada animal tratado	80 mg IVM x 45% eliminación= 36 mg IVM 80 mg IVM x 90% eliminación = 72 mg IVM
• Cantidad total de IVM eliminada a través de las heces por todos los animales tratados	2457 vacas x 36 mg IVM= 88452 mg IVM 2457 vacas x 72 mg IVM= 176904 mg IVM
• Valor de PEC de IVM en los sedimentos	
$\frac{88452 \text{ mg IVM}}{5252800000 \text{ kg sedimentos}} = 0,0000168 \text{ mg IVM/kg} = 0,0168 \mu\text{g IVM/kg}$	
$\frac{176904 \text{ mg IVM}}{5252800000 \text{ kg sedimentos}} = 0,0000337 \text{ mg IVM/kg} = 0,0337 \mu\text{g IVM/kg}$	
Dimensiones del área de estudio	
Superficie total de establecimientos	65,66 km ² = 65660000 m ²
Volumen de los primeros 5 cm de sedimento	0,05 m x 65660000 m ² = 3283000 m ³
Masa de sedimentos**	3283000 m ³ x 1600 kg/m ³ = 5252800000 kg

*dosis recomendada para bovinos (Halley et al., 1989).

** Dato de densidad de sedimentos de acuerdo con Colombo et al. (2021).

Muestreo ambiental

Variabilidad ambiental y fisonomía de los sitios de muestreo

Los sitios de muestreo mostraron un alto grado de variabilidad en cuanto a su composición vegetal a gran escala, presencia de agua, línea de costa y altura del albardón (Figura 22) a lo largo de los muestreos.



Figura 22- Variabilidad de los sitios de muestreo a lo largo de los muestreos. “Zanjón Acosta”: noviembre de 2018 (a) y agosto de 2019 (b); “El árbol”: noviembre de 2018 (c) y agosto de 2019 (d); “Paraná Viejo”: noviembre de 2018 (e) y agosto de 2019 (f).

Captura de juveniles de sábalo

Se capturaron alrededor de 50 ejemplares de *P. lineatus* juveniles (3,0-6,0 cm de Long. Estándar) en las lagunas adyacentes a los corrales ganaderos de la isla El Espinillo únicamente en diciembre de 2016. Al momento de las capturas la profundidad de la laguna era de entre 0,5 a 1,0 m y se encontraba plenamente conectada con el cauce principal del río Paraná. Las capturas exitosas fueron hechas en su totalidad con red de arrastre.

Parámetros fisicoquímicos de los sitios muestreados

Los valores promedio registrados de los parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo están en la tabla 2.

Tabla 2-Parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo.

	Fechas de muestras	
	nov-18	ago-19
Temperatura (°C)	26,6±0,8	16,2±1,3
Conductividad (μS/cm)	67,5±3,5	116,7±5,8
pH	6,6±0,1	6,9±0,1
Oxígeno disuelto (mg/L)	7,4±0,3	50,0±0,0

Concentración ambiental de la ivermectina

En la tabla 3 se reportan los niveles de IVM encontrados en los distintos compartimentos ambientales.

Tabla 3- Concentración ambiental de la IVM encontrada en los distintos compartimentos ambientales.

	Fechas de muestras				
	dic-16	ene-17	nov-18	may-19	ago-19
Fracción soluble	-	ND	ND	ND	ND
MPS (μg/kg)	-	ND	ND	298,5	ND
Sedimentos (μg/kg)	-	ND	ND	ND	ND
Músculo de peces (μg/kg)	D	-	-	-	-

“D”: detectable no cuantificable; “ND”: no detectable; “-”: indica ausencia de muestras

No se detectó IVM en sedimentos o en agua superficial proveniente de los sitios de muestreo. Se detectaron concentraciones cuantificables de IVM en el material particulado en suspensión en mayo de 2019 en el sitio denominado “Zanjón Acosta” (Tabla 3).

En las muestras de músculos de peces juveniles se detectó la presencia de IVM pero los niveles fueron bajos y no permitieron la cuantificación adecuada con el método utilizado (Tabla 3).

Discusión

Variabilidad ambiental

A lo largo de las campañas de muestreo la variabilidad ambiental fue un factor clave y condicionante para la toma de muestras. Si bien los parámetros fisicoquímicos presentan una

variabilidad estacional (ej.: la temperatura) el principal condicionante de la variabilidad observada parece ser el nivel hidrométrico.

En el valle del Bajo Río Paraná, los cuerpos de agua lénticos y el área de paisaje llano circundante son fuertemente afectados por las fluctuaciones del nivel del agua del régimen hidrológico del Paraná (Bonetto, 1975; Neiff, 1990). A medida que aumenta la descarga del río durante la primavera y el verano y el nivel del agua supera los 3 m (Del Barco et al., 2012), los humedales y las cuencas poco profundas se inundan y los lagos dentro de las islas del valle adquieren plena conectividad. Esta situación de mayor conectividad de los cuerpos de agua pudo observarse en los muestreos realizados durante noviembre de 2018 y en diciembre de 2016. Por el contrario, el muestreo de agosto de 2019 coincidió con un período de aguas bajas. El muestreo en condiciones de aguas altas de 2016 fue coincidente con el fenómeno climático de “El Niño Oscilación Sur” (ENOS), durante el cual las precipitaciones fueron abundantes y el nivel hidrométrico incrementó de manera significativa por encima de los niveles esperados. El ENOS afecta las descargas de agua de los ríos en todo el mundo por su influencia en los patrones de lluvia (Depetris et al., 1996; Poveda y Mesa, 1997; Camilloni y Barros, 2003). Por otro lado, el muestreo realizado en 2016 fue el único donde se reportaron capturas de juveniles de sábalo. La presencia de juveniles en las lagunas de la planicie de inundación y los eventos hidrológicos de aguas altas asociadas al ENOS ya han sido reportados en esta región (Lozano et al., 2019).

Estimación teórica de la concentración ambiental de ivermectina

Las PEC de IVM obtenidas en esta tesis son coherentes con las reportadas por otros autores. Kövecses y Marcogliese (2005) estimaron valores de hasta 0,042 μg IVM/kg en sedimentos de lagunas próximas a sitios de cría de ganado vacuno. No obstante, en una evaluación de riesgo ambiental sobre la IVM en distintos tipos de suelos y usos pecuarios, Liebig et al. (2010) estimaron concentraciones en suelo y sedimentos que van desde los 0,33 a los 6,22 μg IVM/kg dependiendo del tipo e intensidad de la actividad ganadera. Estos últimos valores de PEC para IVM en sedimentos son un orden de magnitud mayor a los reportados en esta tesis.

Es importante destacar que la estimación realizada en esta tesis consideró una única aplicación anual de IVM. En la región en estudio, para ser eficientes con los recursos de pastoreo, los ganaderos locales han implementado una serie de prácticas que incluyen la inyección sistemática y frecuente de ganado con IVM. Esto implica que el PEC obtenido podría estar subestimando el número de aplicaciones y por lo tanto la concentración de IVM. En muchos casos esta aplicación se realiza sin una prescripción veterinaria adecuada (Quintana et al., 2019; Mesa et al., 2020). Por otro lado, muchos productores provenientes de otras provincias de la

región realizan la invernada (el engorde) de sus animales en las islas por lo que esos animales no se encuentran registrados en el departamento de Victoria. Este hecho puede impactar en el número total de animales en determinado momento del año, afectando al cálculo de IVM liberada al ambiente.

Concentración ambiental de la ivermectina en el sistema isla El Espinillo-La Invernada

Debido a las características hidrofóbicas ya descritas para la IVM, era esperable no detectar niveles cuantificables en la fracción soluble del agua. Este resultado es compatible con lo reportado por otros autores (Mesa et al., 2020; Liebig et al., 2010; Kövecses y Marcogliese, 2005). Por el contrario, y a raíz del PEC calculado, era esperable detectar IVM en las muestras de sedimentos, principalmente por la elevada cantidad de materia orgánica e hidrofobicidad de este compartimento ambiental.

Mesa et al. (2020) reportó niveles elevados de IVM en sedimentos (entre 1,5 y 17,1 $\mu\text{g/kg}$) en una localidad ubicada a 150 km al norte de nuestro sitio de muestreo, en la ciudad de Diamante. El sitio analizado por los autores también comprende una serie de islas con establecimientos ganaderos sobre la planicie de inundación del río Paraná. El diseño experimental en este caso consideró una serie de aplicaciones de IVM de dosis y momento de aplicación previamente conocidos. Si bien los autores analizaron de manera diferencial las muestras de heces y sedimentos es posible que, dada la elevada densidad de ganado en la región estudiada, una fracción de las muestras de sedimentos contenga heces de ganado y por lo tanto mayores niveles de IVM de lo esperado.

Si bien no se detectaron niveles de IVM en los sedimentos, se detectaron valores particularmente elevados de IVM en el MPS. El sitio donde fue detectada la IVM ("Zanjón Acosta") es un arroyo interno que escurre sus aguas desde una laguna interna de la isla El Espinillo próxima a los corrales hacia el cauce principal del río Paraná Viejo. Al momento del muestreo, la hacienda se encontraba en la isla y las aguas próximas al ganado escurrían en este arroyo.

Cuerpos de agua con altos niveles de materia orgánica en suspensión, como los ríos Paraná y Uruguay de la cuenca del Río de la Plata (Bergamino et al., 2017; Drago, 2007), podrían reportar concentraciones más altas de IVM debido a su alta hidrofobicidad. En este sentido, Mesa et al. (2020) reportaron valores de 1,24 ng/g IVM en MPS en lagos de planicie de

inundación del río Paraná adyacentes a zonas de cría de ganado. Sin embargo, los niveles reportados por estos autores son significativamente más bajos a los encontrados en esta tesis.

En cuanto a la detección de IVM en músculo de juveniles de sábalo y, aunque los niveles hallados fueron bajos, fue posible identificar el compuesto. A pesar del hábito trófico iliófago de *P. lineatus* es probable que el tiempo de exposición de esos juveniles a los sedimentos o aguas contaminados con IVM fuera bajo. *P. lineatus* es una de las pocas especies de peces que obtienen su nutrición de los sedimentos y la biopelícula bentónica (también conocidos como peces comedores de lodo o iliófagos) (Bowen, 2021). La dieta de esta especie es una biopelícula bentónica floculante compuesta por bacterias, algas y materia orgánica no viva presente en los sedimentos (Bowen, 2021). Estos hábitos tróficos podrían ser una vía directa para la ingesta de IVM de los sedimentos.

Un juvenil de sábalo capturado en el mes de diciembre en la región puede tener una edad máxima de 3 meses, de los cuales solo un mes estuvo en contacto con la planicie de inundación (Lozano et al., 2019). Sin embargo, debido a su rápido crecimiento en este estadio de desarrollo, la cantidad de materia transformada en biomasa puede ser elevada, afectando directamente a la incorporación de IVM al músculo y eventualmente a los lípidos. En este contexto, los efectos de una exposición experimental a IVM en sedimentos y aguas con concentraciones ambientales fue evaluado en el capítulo correspondiente.

Bibliografía

Alvinerie, M., Sutra, J. F., Galtier, P., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Lanusse, C. (1999). Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle. *Research in Veterinary Science*, 66(1), 57-61. <https://doi.org/10.1053/rvsc.1998.0240>

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., tajnbaher, D., Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>

APHA. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), Washington, DC.

Ben, W., Qiang, Z., Adams, C., Zhang, H., Chen, L. (2008). Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1202(2), 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.014>

Bergamino, L., Schuerch, M., Tudurí, A., Carretero, S., García-Rodríguez, F. (2017). Linking patterns of freshwater discharge and sources of organic matter within the Río de la Plata estuary and adjacent marshes. *Marine and Freshwater Research*, 68(9), 1704-1715. <https://doi.org/10.1071/MF16286>

Blume, R. R., Younger, R. L., Aga, A., Myers, C. J. (1976). Effects of residues of certain anthelmintics in bovine manure on *Onthophagus gazella*, a non-target organism. *Southwest Entomology* 2:100–103.

Bonetto, A. A. (1975). Hydrologic regime of the Parana River and its influence on ecosystems. En: A. D. Hasler (Ed.), *Coupling of land and water systems* (pp. 175–198). New York, NY: Springer-Verlag.

Bowen, S. H. (2021). Digestion and assimilation of benthic biofilm by the Sábalo, *Prochilodus lineatus*. *Journal of Fish Biology*, 100(1), 107-116. <https://doi.org/10.1111/jfb.14924>

Boxall, A. B. A., Fogg, L. A., Blackwell, P. A., Blackwell, P., Kay, P., Pemberton, E. J., Croxford, A. (2004). *Veterinary Medicines in the Environment Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 1-91). New York, NY: Springer New York.

Bulman, M. G. (2013). Desarrollo de la Ivermectina en Argentina y países vecinos: el antiparasitario completo que hizo huella y marcó una era. Parte II: 1992 – 2011. *Revista Veterinaria Argentina*, 30(301).

Camilloni, I. A., Barros, V. R. (2003). Extreme discharge events in the Paraná River and their climate forcing. *Journal of Hydrology*, 278(1), 94-106. [https://doi.org/10.1016/S0022-1694\(03\)00133-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1694(03)00133-1)

Campbell, W., Fisher, M., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Jacob, T. (1983). Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, 221(4613), 823-828. <https://doi.org/10.1126/science.6308762>

Chiummiento, J. (2020). Establecimientos ganaderos registrados y la presencia de incendios: mapa interactivo. <https://n9.cl/pfoct>

Colombo, F., Serra, J., Cabello, P., Bedmar, J., Isla, F. I. (2021). Chronology of recent sedimentary infill of the Inner Río de la Plata Estuary, Argentina. *Journal of Iberian Geology*, 47(4), 663-684. <https://doi.org/10.1007/s41513-021-00176-x>

Del Barco, D., Rozzatti, J. C., Figueroa, D., Civetti, R., (2012). Monitoreo de desembarcos de la pesquería artesanal de *Prochilodus lineatus* (sábalo) período 2009–2012. <http://www.santafe.gob.ar/index.php/web/content/download/156418/762382/file/Monitoreo%20de%20des%20embarcos%20comerciales%202009-2012.pdf>

Depetris, P. J., Kempe, S., Latif, M., Mook, W. (1996). ENSO-controlled flooding in the Paraná River (1904–1991). *Naturwissenschaften*, 83(3), 127-129.

Drago, E. C. (2007). The physical dynamics of the river–lake floodplain system. En: M. H. Iriondo, J. C. Paggi y M. J. Parma (eds.), *The Middle Paraná River: Limnology of a Subtropical Wetland*. pp. 83–122. Springer-Verlag: Heidelberg, Alemania.

Durden, D. A. (2007). Positive and negative electrospray LC–MS–MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin,

eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *Journal of Chromatography B*, 850(1–2), 134-146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.014>

FDAH — Fort Dodge Animal Health. (1997). Environmental Assessment, CYDECTIN® moxidectin 0.5% Pour-on for Cattle. Technical Report. Sheet No. AG07187-2. Fort Dodge Animal Health, Wyeth Inc.

Floate, K. D., Wardhaugh, K. G., Boxall, A. B. A., Sherratt, T. N. (2005). Fecal residues of veterinary parasiticides: Nontarget Effects in the Pasture Environment. *Annual Review of Entomology*, 50(1), 153-179. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130341>

Forbes, A. B. (1993). A review of regional and temporal use of avermectins in cattle and horses worldwide. *Veterinary Parasitology*, 48(1), 19-28. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90141-9](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90141-9)

Halley, B. A., Nessel, R. J., Lu, A. Y. H., Roncalli, R. A. (1989). The environmental safety of ivermectin: An overview. *Chemosphere*, 18(7), 1565-1572. [http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535\(89\)90046-5](http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(89)90046-5)

Huidobro, S. (2016). Producción por Acuicultura en Argentina en el 2015. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Disponible en http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/acuicultura/06_Publicaciones/index.php

Kennedy, I. R., Ahmad, N., Beasley, H., Chapman, J., Hobbs, J., Simpson, B., Woods, N. (1998). Quality assurance in pesticide sampling and analysis. LWRDC Occasional Paper(14/98).

Kövecses, J., Marcogliese, D. (2005). Avermectins, Potential Environmental Risks and Impacts on Freshwater Ecosystems in Québec: [Montréal]: Environment Canada, St. Lawrence Centre.

Lozano, I. E., Llamazares Vegh, S., Gómez, M. I., Piazza, Y. G., Salva, J. L., Fuentes, C. M. (2019). Episodic recruitment of young *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) during high discharge in a floodplain lake of the River Paraná, Argentina. *Fisheries Management and Ecology*, 26(3), 260-268. <https://doi.org/10.1111/fme.12348>

Mesa, L., Gutiérrez, M. F., Montalto, L., Perez, V., Lifschitz, A. (2020). Concentration and environmental fate of ivermectin in floodplain wetlands: An ecosystem approach. *Science of The Total Environment*, 706, 135692. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135692>

Mkandawire, M., Teixeira da Silva, J. A., Dudel, E. G. (2014). The Lemna Bioassay: Contemporary Issues as the Most Standardized Plant Bioassay for Aquatic Ecotoxicology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(2), 154-197. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.710451>

Neiff, J. J. (1990). Ideas para la interpretación ecológica del Paraná. *Interciencia*, 15(6), 424-441.

Poveda, G., Mesa, O. J. (1997). Feedbacks between Hydrological Processes in Tropical South America and Large-Scale Ocean–Atmospheric Phenomena. *Journal of Climate*, 10(10), 2690-2702. [https://doi.org/10.1175/1520-0442\(1997\)010<2690:fbhpit>2.0.co;2](https://doi.org/10.1175/1520-0442(1997)010<2690:fbhpit>2.0.co;2)

PROSAP. (2009). Estrategia Provincial Para el Sector Agroalimentario. Provincia de Entre Ríos Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (2009).

Quintana, R. D., Bó, R. F., Astrada, E., Reeves, C. (2014). Lineamientos para una ganadería ambientalmente sustentable en el Delta del Paraná. Buenos Aires: Wetlands International.

Quintana R. D., editor (2019). Ganadería en Humedales. Boné E., V. Casa, G. Mataloni y V. Sfara; M. Andelman, editora. Ganadería y calidad de agua en el Delta del Paraná, Desafíos y recomendaciones. Fundación Humedales / Wetlands International. Buenos Aires, Argentina.

SENASA. (2022). Datos de las campañas de vacunación antiaftosa. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/bovinos-y-bubalinos-produccion-primaria/febre-aftosa>

Shoop, W., Soll, M. (2002). Ivermectin, abamectin and eprinomectin. En: J. Vercruysse y RS Rew (eds.), *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. Oxon (UK): Cabi. p 1–29.

Tong, L., Li, P., Wang, Y., Zhu, K. (2009). Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere*, 74(8), 1090-1097. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.051>

Capítulo 2:

**Efectos de la
ivermectina en
juveniles de
*Prochilodus lineatus***

Introducción

El uso de los ensayos biológicos en laboratorio

Tanto la evidencia biológica como la química son necesarias para evaluar el riesgo para los ecosistemas de manera efectiva. La capacidad de detectar un compuesto en el ambiente no garantiza que se puedan predecir sus efectos biológicos. Por otro lado, el hecho de no detectar una sustancia química liberada en el ambiente no excluye su potencial presencia y sus potenciales efectos (Cairns y Pratt, 1989). Cuando interactúan varias sustancias químicas, la integración de los efectos en un sistema biológico es una evidencia confiable para predecir o detectar impactos adversos (Cairns y Pratt, 1989).

Para evaluar los efectos perjudiciales potenciales de un contaminante sobre la biota, es necesario establecer una relación cuantitativa reproducible entre la exposición a las sustancias químicas y alguna medida de daño al organismo o grupo de organismos bajo investigación. La mayoría de los datos toxicológicos ambientales actuales provienen de ensayos de laboratorio controlados (Peluso, 2021). Los ensayos biológicos de laboratorio o bioensayos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Castillo, 2004).

Los efectos de un contaminante pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. Por tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo o la biocenosis, y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico. El potencial nocivo de una sustancia puede ser contrarrestado por el sistema biológico a través de diferentes estrategias, tales como reacciones metabólicas de detoxificación, excreción de tóxicos, etcétera. Por tanto, la toxicidad aparente evaluada en un ensayo biológico es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico (Castillo, 2004).

Los bioensayos cumplen dos objetivos principales. El primero está vinculado a enfoques mecanísticos que, debido a que utilizan niveles biológicos de organización más bajos y pueden evaluar una gran cantidad de parámetros, brindan una mejor comprensión de los mecanismos ecotoxicológicos (Boudou y Ribeyre, 1997). El segundo objetivo, desde un punto de vista más aplicado, es predecir la toxicidad de productos químicos puros o efluentes en base al uso de una

especie o una batería de pruebas de una sola especie, llevándose a cabo en el laboratorio bajo condiciones controladas (requisitos de control de calidad bajo procedimientos operativos estandarizados). Los bioensayos de laboratorio son un procedimiento común para evaluar la toxicidad a nivel de organismo, en una gran variedad de especies y en los principales niveles ecológicos o tróficos (es decir, desde bacterias hasta peces y desde descomponedores hasta consumidores finales) (Piva et al., 2011). La mayoría de los estudios regulatorios, establecidos para estimar el riesgo involucrado en la comercialización de un nuevo producto químico o en la evaluación de riesgo ambiental, se basan en estas metodologías (Bartell et al., 1992).

Los biomarcadores como herramienta para evaluar la exposición a contaminantes ambientales

En el ambiente acuático, la exposición de los organismos vivos a xenobióticos y otros contaminantes da lugar a interacciones entre el sistema químico y el biológico, que pueden producir alteraciones bioquímicas y/o respuestas adaptativas (Burkina, 2014). De esta forma pueden promoverse efectos sobre la biota sin llegar a ser evidentes hasta que los cambios se manifiestan a nivel poblacional o ecosistémico, momento en el que pudiera ser demasiado tarde para tomar medidas adecuadas. Una estrategia que permite determinar el impacto de estos contaminantes, sobre todo en concentraciones bajas o subletales, así como sus potenciales efectos, es el uso de biomarcadores o señales de alerta temprana (Fent, 2004; Linde-Arias et al., 2008).

Un biomarcador es una característica que se mide y evalúa objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a la exposición a sustancias químicas ambientales (van der Oost et al., 2003). Estas características o respuestas observadas, obtenidas en un bioensayo sobre el organismo afectado, son conocidas frecuentemente como *toxicological endpoints* o puntos finales toxicológicos (Hartl, 2002) y son considerados como medidas de toxicidad. Tradicionalmente los biomarcadores han sido divididos en tres categorías, según WHO (1993) y a la revisión de van der Oost et al. (2003), los podemos clasificar en:

- *Biomarcadores de exposición*: permiten detectar y medir sustancias exógenas, sus metabolitos o el producto de interacción a nivel molecular o celular dentro del organismo expuesto al agente xenobiótico, indicando que el organismo ha estado expuesto a una determinada clase de compuestos.
- *Biomarcadores de efecto*: incluyen mediciones bioquímicas, fisiológicas u otras referidas a las alteraciones que pudieran producirse dentro de los tejidos o en fluidos biológicos

de los organismos, las cuales pueden asociarse al establecimiento de un posible daño en la salud, indicando que tanto la exposición como los efectos adversos han ocurrido.

- *Biomarcadores de susceptibilidad*: indican la habilidad inherente o adquirida de los organismos de responder a la exposición de compuestos xenobióticos específicos, incluyendo factores genéticos y cambios en receptores, los cuales alteran la susceptibilidad de los individuos frente a dicha exposición.

De esta manera, los biomarcadores representan herramientas clave para estimar las consecuencias ecológicas de la contaminación antrópica de los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, no existe un único biomarcador que pueda proporcionar un diagnóstico completo de los efectos de la exposición a los contaminantes en un organismo (Burkina, 2014). En consecuencia, se recomienda el uso de una batería de biomarcadores complementarios (enfoque multinivel) para comprender cómo responde un organismo a la exposición a un contaminante. Este enfoque multinivel, en donde diferentes respuestas biológicas pueden evaluarse desde un nivel molecular hasta comportamental, es esencial para determinar el estado general de salud del organismo (Lozano et al., 2021). Además, este enfoque permite la extrapolación de la relación entre respuestas en diferentes niveles de organización biológica (Lee y Choi, 2006). Entre los principales biomarcadores utilizados en estudios con peces se encuentran los de estrés oxidativo, disrupción endocrina, efectos genotóxicos, comportamentales, hematológicos y cambios histopatológicos, entre otros (Hook et al., 2014; Colin et al., 2016; Davico et al., 2020; Götte et al., 2020).

Biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo

Al ingresar los contaminantes en los vertebrados acuáticos, estos son sometidos a procesos toxicocinéticos, incluida la absorción, distribución, biotransformación y excreción. La biotransformación es un término específico que se utiliza para describir la transformación bioquímica de sustancias químicas en un organismo vivo para protegerlo contra los posibles efectos tóxicos de un xenobiótico (Burkina, 2014). Las reacciones metabólicas de los fármacos y otros contaminantes ocurren principalmente en el hígado y han sido divididas en dos categorías: reacciones de fase I (biotransformaciones hidrolíticas, reductoras y oxidativas) y reacciones de fase II (conjugaciones), seguidas de excreción (Figura 23).

Las reacciones de fase I generalmente agregan uno o más grupos polares funcionales (-OH, -NH₂, -SH, -COOH) a una toxina, lo que permite que tenga lugar la reacción de fase II (Williams, 1963). Estas reacciones son catalizadas por el grupo de enzimas de la familia citocromo P450 (CYP450) y otras enzimas asociadas con el retículo endoplásmico liso (oxigenasas, enzimas que eliminan el oxígeno reducido, enzimas hidrolíticas y otras) (Nebert et

al., 2004; Lynch y Price, 2007). Si los metabolitos de las reacciones de la fase I son lo suficientemente solubles en agua, pueden excretarse fácilmente en esta instancia. Los productos de la fase II son más solubles en agua que el compuesto original, por lo que son excretados con mayor facilidad y generalmente carecen de actividad farmacológica y toxicidad en los organismos (McDonnell et al., 2013). La fase II de detoxificación involucra por lo general una conjugación bioquímica, en la cual varias enzimas en el hígado unen moléculas o grupos funcionales como ácido glucurónico, sulfato, glicina y otros aminoácidos a la sustancia tóxica. La reacción de conjugación neutraliza los tóxicos y los productos intermedios reactivos que quedan de la fase I de detoxificación. Las vías de fase II, como la metilación y la acetilación, frenan o atenúan la actividad biológica, mientras que la conjugación de glutatión (GSH) facilita la excreción del conjugado hidrosoluble, mecanismo que protege al cuerpo contra compuestos o metabolitos químicamente reactivos (Liska et al., 2006; Burkina et al., 2013).

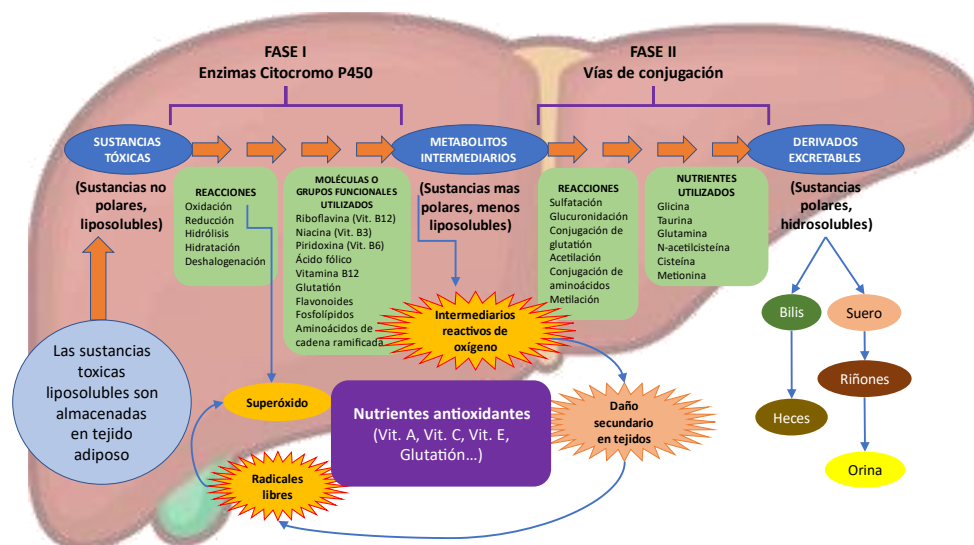


Figura 23- Vías de detoxificación hepática (Fase I y Fase II) (modificado de Liska et al. 2006).

Como parte del proceso de detoxificación mediado por p450, como puede observarse en la figura 23, la reducción parcial del oxígeno da lugar a la producción de especies intermedias reactivas como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el oxígeno singlete (1O_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo $HO^{\cdot}$ (Asada y Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Fridovich, 1998; Halliwell y Gutteridge, 2015), denominadas especies reactivas de oxígeno (EROs). Todos los organismos aerobios producen EROs, a través de su metabolismo normal, a partir de la cadena de transporte de electrones mitocondriales en (i) el complejo I (NADH deshidrogenasa) y (ii) entre la ubiquinona y el complejo III (Brookes, 2005). El radical superóxido suele ser la primera ERO en formarse, lo que eventualmente lleva a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y posteriormente a radicales hidroxilo, los cuales son, químicamente, las más dañinas de las EROs

(Asada y Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Fridovich, 1998; Halliwell y Gutteridge, 2015). Si bien no es una especie radical, el H_2O_2 puede atravesar fácilmente las membranas y tiene una vida media más prolongada que la mayoría de las especies radicales derivadas del oxígeno. En presencia de iones metálicos con valencia variable, el H_2O_2 reacciona con ellos (a través de la reacción de Fenton) formando el radical hidroxilo altamente reactivo, el cual es capaz de extraer electrones y protones de las macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos) con las que entra en contacto, generando así más electrones desapareados y especies radicales (Birnie-Gauvin et al., 2017).

Debido a que las EROs se generan y eliminan continuamente, su concentración es un parámetro dinámico, es decir, que se establece un estado estacionario de concentraciones de EROs. Esto quiere decir que, en situaciones normales, la cantidad de EROs producida es prácticamente igual a la eliminada. Sin embargo, por diferentes razones (ej.: exposición a contaminantes), la concentración de EROs puede cambiar y provocar una alteración del estado redox que se denomina estrés oxidativo. El estrés oxidativo es una situación en la que la concentración de EROs en estado estacionario aumenta de forma transitoria o crónica, pudiendo alterar el metabolismo celular y su regulación y dañando los constituyentes celulares (Lushchak, 2011, 2016). En otras palabras, cuando el aumento en la producción de las EROs supera la capacidad de un organismo para contrarrestar a las especies reactivas con sus propios sistemas de defensa antioxidantes, se establece un estado de estrés oxidativo (Ahmad et al., 2000).

Los organismos utilizan tanto antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas) como no enzimáticos (p. ej., vitaminas y glutatión), para contrarrestar los efectos tóxicos de las EROs (Cadenas, 1997; Valko et al., 2007). Los antioxidantes neutralizan los radicales libres al ceder uno de sus propios electrones. La enzima superóxido dismutasa (SOD) elimina el radical libre superóxido (O_2^-) al convertirlo en peróxido de hidrógeno (Fridovich, 1998; Huang et al., 2000; Halliwell y Gutteridge, 2015) que, a su vez, puede ser eliminado con la acción de la enzima catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GPx) (Modesto y Martínez, 2010).

El glutatión es un antioxidante no enzimático de bajo peso molecular presente en las células y es una importante molécula tiólica que además desempeña funciones de detoxificación, regulación e inmunidad celular (Marán et al., 2009). El glutatión se encuentra en dos formas: el monómero de glutatión reducido (GSH) y el dímero, disulfuro de glutatión (GSSG). Por lo tanto, la relación entre GSH y GSSG puede utilizarse como indicador del estado de estrés oxidativo del organismo, ya que esta relación está determinada por una combinación de las tasas de eliminación de H_2O_2 por parte de GPx, que cataliza la oxidación de GSH a GSSG (Marán et al.,

2009). El GSSG luego es reducido a GSH por la enzima glutatión reductasa (GR) a expensas del NADPH, que es reciclado por la ruta de las pentosas fosfato (Krall et al., 1991). Cuando las células tienen alto poder reductor, es decir en condiciones sin estrés oxidativo, la relación GSH/GSSG es mayor a 1. Esto significa que, en condiciones normales, el GSH reducido es la forma más frecuente de glutatión y constituye hasta el 98 % de las formas de glutatión disponibles (Kosower y Kosower, 1978; Owen, 2010).

La glutatión-S-transferasa (GST) es una enzima de conjugación de fase II durante la biotransformación (Nimmo, 1987). Protege eficazmente las células contra una serie de compuestos hidrofóbicos y electrofílicos, incluidos los productos intermedios y finales de la peroxidación lipídica y los xenobióticos, mediante reacciones de conjugación con los grupos -SH (Modesto y Martínez, 2010). La conjugación de los compuestos con glutatión forma ácidos mercaptúricos, los cuales pueden ser excretados posteriormente (Boyland y Chasseaud, 1969).

Los ácidos grasos poliinsaturados y los colesterolos poseen patrones de oxidación similares, produciendo hidroperóxidos debido a la disponibilidad de grupos metileno bis-alílicos. Los hidrógenos bis-alílicos son muy reactivos con los radicales de oxígeno y se oxidan rápidamente a los productos primarios de la peroxidación lipídica (Niki, 2009). La descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados durante el proceso de peroxidación lipídica induce daños estructurales y químicos en las membranas celulares (Livingstone, 2001; Amiard-Triquet et al., 2013). Durante el proceso de peroxidación lipídica se produce la formación de diferentes compuestos y el daño a la membrana puede evaluarse en la fase intermedia del proceso (Hermes-Lima et al., 1995) o en la fase final del proceso (Amiard-Triquet et al., 2013). El producto final mayoritario de la peroxidación lipídica, el malondialdehído (MDA), reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un complejo MDA-TBA que puede ser medido y cuantificado y es utilizado como biomarcador (Ohkawa et al., 1979; Oakes y Van Der Kraak, 2003).

En la figura 24, se representan las reacciones químicas correspondientes a las defensas antioxidantes más relevantes.

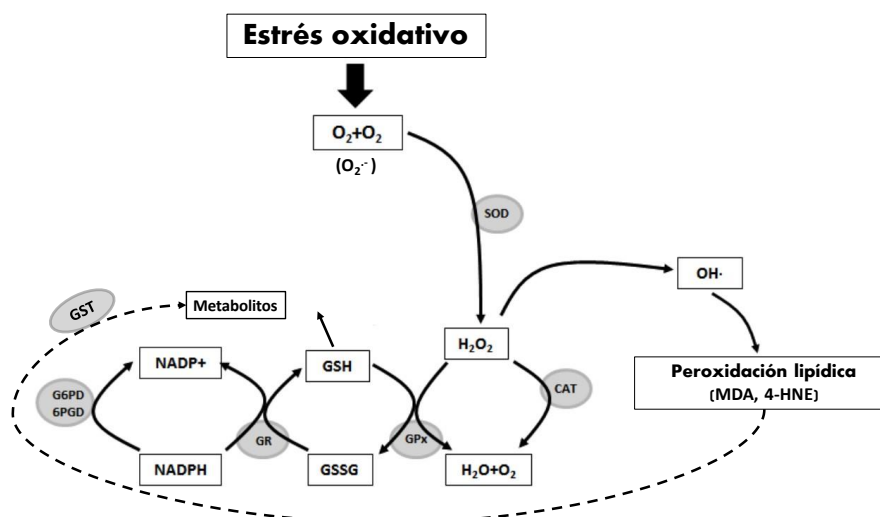


Figura 24- Esquema de los principales mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa; GPx: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; GST: glutatión-S-transferasa; G6PD: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 6PGD: 6-fosfogluconato deshidrogenasa; NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato-Oxidasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; 4-HNE: 4-hidroxinonenal (producto de la peroxidación lipídica); MDA: Malondialdehído (producto de la peroxidación lipídica). (modificado de Scarcia, 2013; McDonnell-Dowling y Kelly, 2017).

Las alteraciones de cada una de estas enzimas durante la defensa antioxidante se utilizan como biomarcadores de estrés oxidativo (Moraes et al., 2009). Numerosos estudios han evaluado la actividad (o los niveles) de las enzimas SOD, CAT, GR, GPx y GST y los niveles de TBARS en organismos acuáticos, particularmente en peces, como marcadores sensibles de trastornos fisiológicos (Stoliar y Lushchak, 2012; Lushchak, 2016; Birnie-Gauvin et al., 2017).

Biomarcadores de neurotoxicidad

Existen otros biomarcadores bioquímicos para evaluar los efectos de los contaminantes en los organismos. La actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) se utiliza ampliamente como método de detección rápida de la toxicidad de ciertos plaguicidas y contaminantes (Dutta y Arends, 2003; Silva Filho et al., 2004). La AChE es una enzima que cataliza la hidrólisis de la acetilcolina en colina y acetato en el espacio sináptico (Moraes et al., 2009) (Figura 25). Cuando se produce la inhibición de la actividad de la AChE, el neurotransmisor acetilcolina (ACh) no se hidroliza en las sinapsis nerviosas y las uniones neuromusculares, provocando una cantidad anormal de ACh en estos sitios, lo que conduce a una sobreactivación del tejido muscular (Roex et al., 2003). Esta reducción de AChE puede afectar la locomoción y el equilibrio en los organismos expuestos pudiendo afectar la alimentación y el metabolismo (Roex et al., 2003), los reflejos de escape y el comportamiento reproductivo (Saglio y Trijasse, 1998; Bretau et al., 2000; dos Santos Miron et al., 2005).

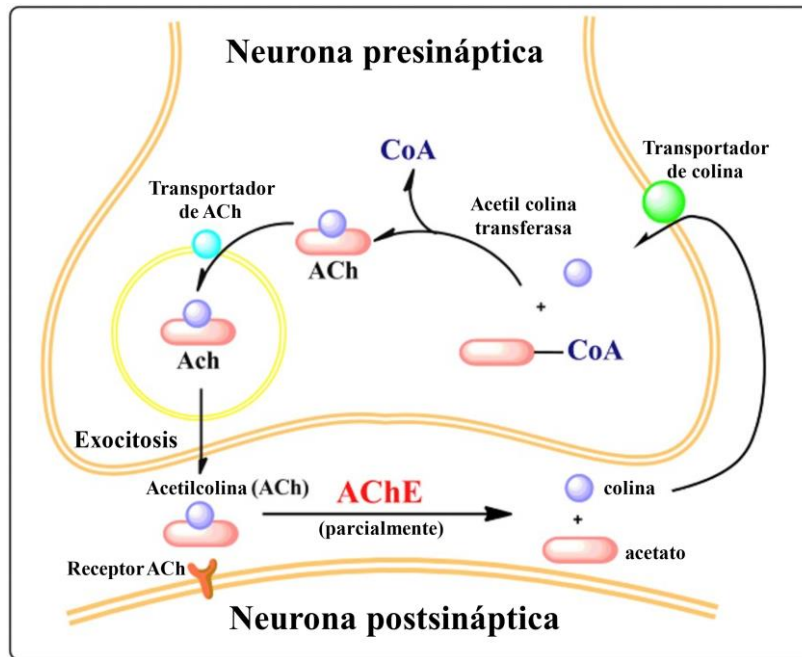


Figura 25- Metabolismo de ACh por AChE. La ACh es parcialmente hidrolizada por la AChE en colina y acetato en el espacio sináptico. La colina libre regresa a las neuronas presinápticas a través de un transportador de colina. Luego sigue la combinación con un complejo de acetato y acetil coenzima A (CoA) para resintetizar la ACh mediante la colina acetil transferasa, liberando una molécula de CoA. La ACh penetra en la vesícula y luego sale por exocitosis para iniciar una nueva circulación.

Biomarcadores comportamentales

El análisis del comportamiento proporciona una perspectiva única que vincula la fisiología y la relación de un organismo con su entorno (Little y Brewer, 2001). El comportamiento es una secuencia de acciones cuantificables, que operan a través de los sistemas nerviosos central y periférico (Keenleyside, 1979), y la manifestación acumulativa de procesos genéticos, bioquímicos y fisiológicos esenciales para la vida, como la alimentación, la reproducción y la evitación de depredadores (Kane et al., 2005). El comportamiento permite que un organismo se ajuste a los estímulos externos e internos para enfrentar mejor el desafío de sobrevivir en un entorno cambiante. El comportamiento también es el resultado de adaptaciones a las variables ambientales. Por lo tanto, comportamiento surge de la interacción acumulativa de una variedad de factores bióticos y abióticos que representan la respuesta de un animal a factores internos (fisiológicos) y externos (ambientales, sociales), que relacionan un organismo con otro (Gerhardt, 2007) (Figura 26).

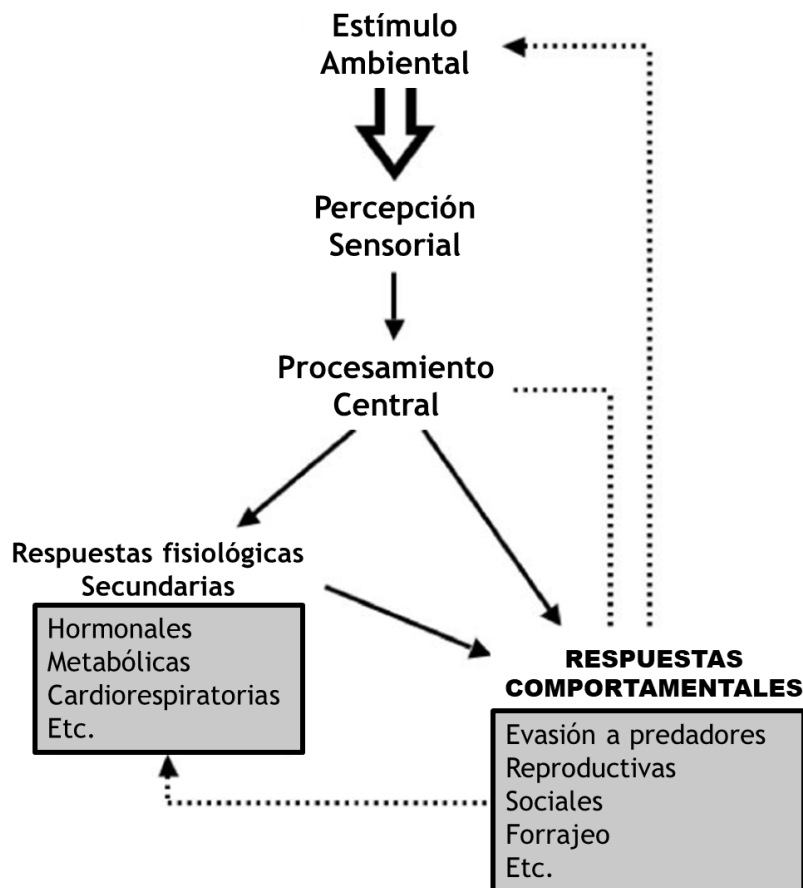


Figura 26- Diagrama de los tipos de respuesta que surgen a partir de un estímulo ambiental (modificado de Scott y Sloman, 2004).

La utilización del comportamiento como biomarcador presenta una serie de beneficios: (1) El comportamiento es un marcador integral de múltiples niveles de organización biológica (Little, 1990; Weis et al., 2001; Scott y Sloman, 2004; Kane et al., 2005; Weis, 2013) ; (2) El comportamiento es uno de los marcadores más sensibles del impacto de la exposición a contaminantes, ya que se observan cambios sustanciales en el comportamiento a concentraciones consideradas subletales (Little, 1990; Dell'Omo, 2002; Zala y Penn, 2004; Gerhardt, 2007; Hellou, 2011; Weis, 2013). De hecho, el comportamiento es de 10 a 1000 veces más sensible que la mortalidad como parámetro de punto final (Gerhardt, 2007; Hellou, 2011). En algunos casos (por ejemplo, peces), los puntos finales comportamentales pueden ser tan sensibles como los biomarcadores bioquímicos y fisiológicos (Passino-Reader et al., 1995; Triebkorn et al., 1997). (3) Por último y más importante, el comportamiento es considerado un marcador de alerta temprana (Hellou, 2011).

Dado que el comportamiento sirve como vínculo entre los procesos fisiológicos y ecológicos, resulta ideal para estudiar los efectos de los contaminantes ambientales. Los peces son un excelente modelo en este sentido, ya que muchos comportamientos de peces

ecológicamente relevantes se observan y cuantifican fácilmente en un entorno controlado (Scott y Sloman, 2004).

El comportamiento natatorio es el biomarcador comportamental más evaluado en los estudios de toxicología en peces (Little y Finger, 1990). Los cambios en el comportamiento natatorio causados por la exposición subletal a contaminantes pueden afectar la capacidad de los peces para alimentarse, evitar la depredación o reproducirse (Little y Finger, 1990).

La neurotoxicidad se observa con frecuencia en los cambios en la forma, la frecuencia o la postura de los movimientos de natación, y los cambios suelen ocurrir mucho antes que la mortalidad (Little y Finger 1990; Little y Brewer 2001). En esta línea, las exposiciones subletales a metales y plaguicidas han demostrado alteraciones en los comportamientos de natación y sirven como modelos para factores de estrés adicionales (Kleerekoper et al., 1972; Brewer et al. 1999; Allin y Wilson, 2000; Kwak et al., 2002). Por ejemplo, en alevines de la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) expuestos a concentraciones de aluminio (300 mg.L^{-1}) en condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 6,1$), el desarrollo de las respuestas locomotoras, la frecuencia de los movimientos de natación y la duración de la actividad se inhibieron significativamente antes de que se observaran efectos sobre la supervivencia o el crecimiento (Cleveland et al. 1991).

Los estudios del movimiento de los peces suelen implicar videografía y cuantificación de los parámetros de movimiento (Kane et al., 2005). Los puntos finales (o *endpoints*) de movimiento están diseñados para discernir alteraciones en los patrones generales de natación en respuesta a la exposición a factores estresantes (Kane et al., 2005). Los criterios de valoración del comportamiento cuantificados a través del análisis del movimiento suelen incluir la distancia total recorrida, la velocidad, la aceleración, los ángulos de giro y la frecuencia, el tiempo dedicado a la natación, así como la distribución horizontal y vertical de los individuos (Little y Finger, 1991; Kane et al., 2005). Las mediciones del comportamiento de natación generalmente se limitan al laboratorio. En el laboratorio, los cambios sutiles que surgen de la exposición pueden confirmarse mediante comparaciones con controles o con respuestas observadas durante un período previo a la exposición (Kane et al., 2005).

Además de los efectos observables que los contaminantes producen sobre la natación, se han estudiado efectos en comportamientos más complejos como la interacción depredador-presa (Scott y Sloman, 2004). Los depredadores pueden afectar a las especies presa en diferente grado, dependiendo en gran medida de la capacidad de la presa para evitar la depredación (Vamosi y Schluter, 2002). Por lo tanto, los contaminantes ambientales que alteran la capacidad de las presas para evitar depredadores podrían afectar potencialmente a las comunidades

acuáticas (Scott y Sloman, 2004). La capacidad de evasión de depredadores de los peces a menudo se altera en respuesta a la exposición a sustancias tóxicas subletales y la literatura contiene numerosos ejemplos de supervivencia reducida en presas expuestas sujetas a un depredador (Scott y Sloman, 2004). De hecho, se ha demostrado que muchos metales y contaminantes orgánicos aumentan la susceptibilidad a la depredación (Hatfield y Anderson, 1972; Kania y O'Hara, 1974; Sullivan et al., 1978; Schneider et al., 1980; Little et al., 1990; Weis y Weis, 1995; Carlson et al., 1998; Zhou y Weis, 1998, 1999). Más aún, se ha demostrado que algunos contaminantes alteran la capacidad de respuesta de los peces durante las últimas etapas de un evento de depredación, al alterar la capacidad de escape de los individuos o la capacidad de formar cardúmenes (Scott y Sloman, 2004; Lozano et al., 2021).

Biomarcadores histológicos

Los cambios histológicos han sido ampliamente utilizados como biomarcadores en la evaluación de la salud de los peces expuestos a contaminantes, tanto en laboratorio (Wester y Canton, 1991; Thophon et al., 2003) como en estudios de campo (Hinton et al., 1992; Schwaiger et al., 1997; Teh et al., 1997). Una de las grandes ventajas del uso de biomarcadores histopatológicos en el monitoreo ambiental es que esta categoría de biomarcadores permite examinar órganos diana específicos, incluyendo branquias, riñón e hígado, que son responsables de funciones vitales como la respiración, la excreción y la acumulación y la biotransformación de xenobióticos en los peces (Gernhofer et al., 2001). Otra ventaja de este tipo de biomarcadores es que, al menos en algunos órganos, se ha demostrado que presentan una buena relación dosis-respuesta (Au, 2004). Por otro lado, las alteraciones que se encuentran en estos órganos suelen ser más fáciles de identificar que las funcionales (Fanta et al., 2003), y sirven como señales de advertencia de daño a la salud animal (Hinton y Laurén, 1990). Estas alteraciones son fácilmente reconocibles y pueden indicar, idealmente, una condición patológica, reflejando también la severidad y duración de los eventos de contaminación (Fonseca et al., 2016). Además, aunque no pueden revelar la identidad de la sustancia tóxica, los biomarcadores histopatológicos pueden identificar el tipo de contaminación a través de su modo de acción, lo que respalda aún más el uso de biomarcadores histopatológicos como indicadores confiables de contaminación ambiental (Colin et al., 2016).

Las branquias de los peces son muy sensibles a los cambios químicos y físicos en el medio ambiente acuático (Fonseca et al., 2016). Debido a su gran superficie y al contacto directo con el agua (Figura 27), las branquias son fácilmente dañadas por numerosos xenobióticos, incluso en bajas concentraciones, siendo el primer órgano diana de los contaminantes ambientales (Karlsson, 1983; Mallatt, 1985; Laurent y Perry, 1991; Mazon et al., 2002; Pandey et al., 2008).

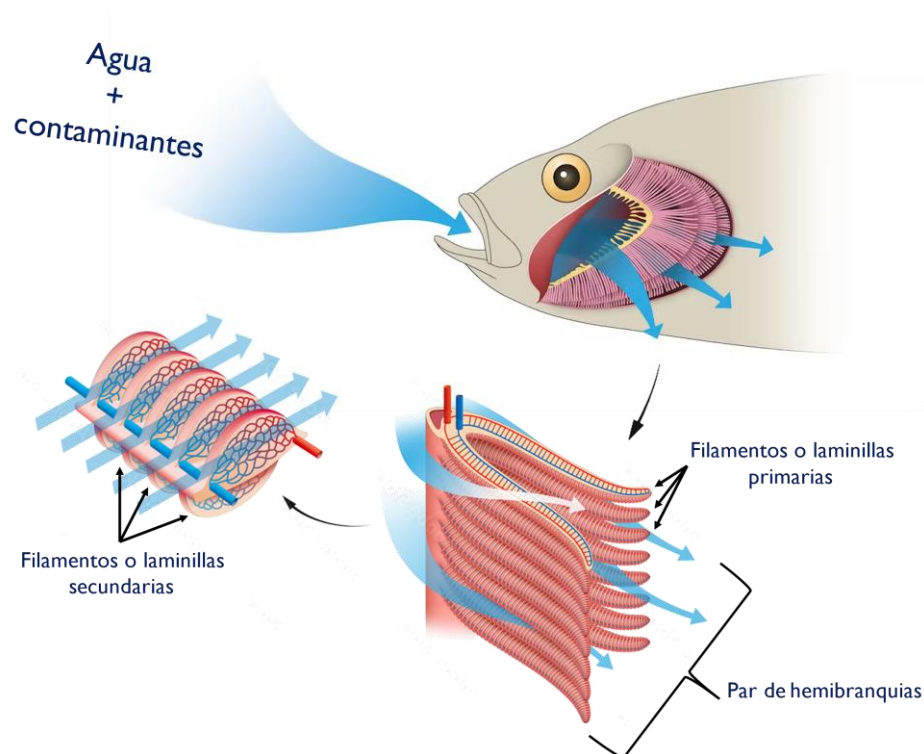


Figura 27- Esquema de la circulación del agua y contaminantes ambientales a través de las branquias donde se da el intercambio gaseoso y de sustancias con el sistema circulatorio.

Los cambios histológicos en las branquias de los peces son considerados biomarcadores valiosos de estrés ambiental en los ecosistemas acuáticos (Barišić et al., 2015; Cruz et al., 2015; Pereira et al., 2013). En la figura 28 se encuentran ilustradas las lesiones más comunes en branquias de peces para la especie *Salmo gairdneri*.

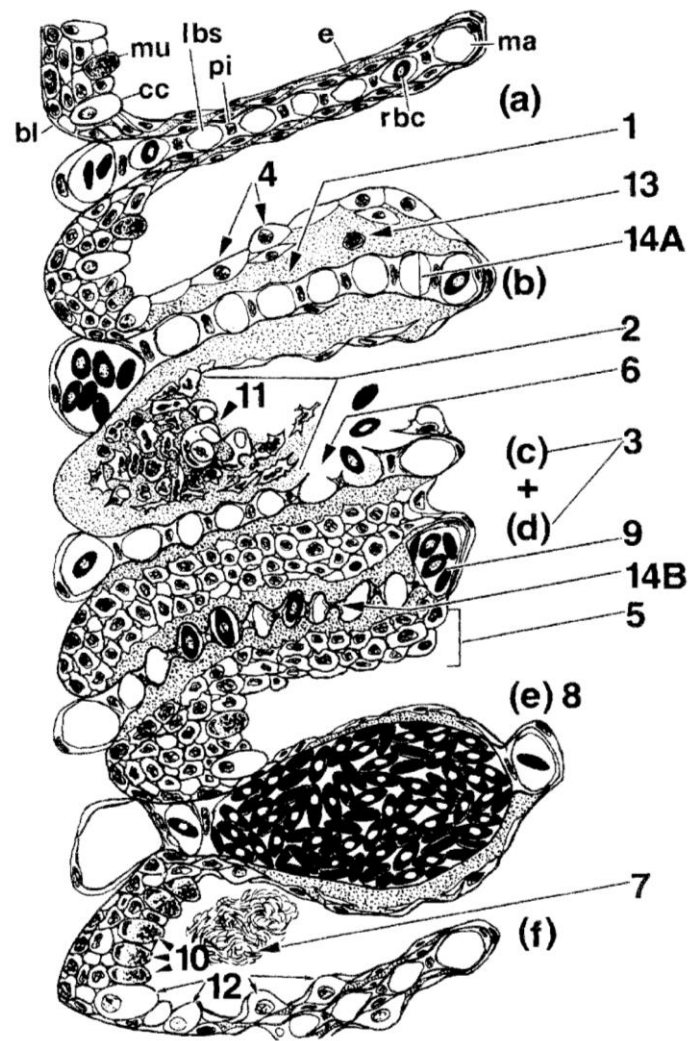


Figura 28- Lesiones branquiales (*Salmo gairdneri*). a: laminilla secundaria normal. b-f: laminillas lesionadas. Las lesiones enumeradas están numeradas del 1 al 14. 1: desprendimiento epitelial; 2: necrosis; 3 fusión lamelar (laminilla c+d); 4: hipertrofia de células epiteliales; 5: hiperplasia del epitelio respiratorio; 6: ruptura epitelial y hemorragia; 7: secreción mucosa; 8: aneurisma lamelar; 9: congestión vascular; 10: proliferación de células mucosas; 11: células ricas en mitocondrias dañadas; 12: proliferación de células ricas en mitocondrias; 13: infiltración de leucocitos en el epitelio; 14A: seno sanguíneo dilatado; 14B: seno sanguíneo contraído. **Abreviaturas:** bl: lámina basal; cc: célula rica en mitocondrias; e: células epiteliales lamelares típicas; lbs: seno sanguíneo lamelar; ma: canal marginal; mu: célula mucosa; pi: célula de pilar; rbc: eritrocito (modificado de Mallat, 1985).

Biomarcadores hematológicos

Los parámetros hematológicos son importantes para evaluar el estado fisiológico de los peces. Sus cambios dependen de la especie, la edad, el momento del ciclo de vida, el estado de madurez y las condiciones de salud (Blaxhall, 1972; Wedemeyer et al., 1983; Golovina y Trombicky, 1989; Zhiteneva et al., 1989; Golovina, 1996; Luskova, 1997; Vosylienė, 1999; Hrubec et al., 2001). De acuerdo con Fernandes y Mazon (2003) estos parámetros están estrechamente relacionados con la respuesta del animal al ambiente, de este modo, el medio donde viven los peces ejerce cierta influencia sobre las características hematológicas (Kori-Slakter, 1985; Gabriel et al., 2004). La estrecha relación de los parámetros hematológicos del animal con el ambiente permite evaluar el estado fisiológico de los peces y se ha utilizado para la detección

de cambios fisiopatológicos en diferentes condiciones de estrés (Nussey, 1995). De esta manera, estos parámetros pueden proveer información diagnóstica sustancial una vez que los valores de referencia son establecidos bajo condiciones estandarizadas (Rey Vázquez, 2012). La evaluación hematológica comprende el recuento de glóbulos rojos, la determinación del hematocrito, la concentración de hemoglobina, los índices hematimétricos derivados de los anteriores, como el volumen corpuscular medio; la hemoglobina corpuscular media, y la concentración de hemoglobina corpuscular media, entre otros (Campbell, 2004).

La respuesta frente al estrés implica también una serie de cambios fisiológicos, incluida la alteración de la composición sanguínea y los mecanismos inmunitarios (Rey Vázquez et al., 2020). Los estudios que analizan los cambios en los parámetros hematológicos y los evalúan como biomarcadores asociados al estrés hemodinámico inducido por contaminantes ambientales proveerán información diagnóstica sustancial una vez establecidos los valores de referencia (Rey Vázquez, 2012).

Los elementos de la serie roja, por ejemplo, pueden aumentar o disminuir su número y volumen, así como el hematocrito y los niveles de hemoglobina citoplasmática, dependiendo de los factores ambientales que estén actuando. El número de eritrocitos puede aumentar rápidamente como resultado de la contracción del bazo (Caldwell y Hinshaw 1994) y de este modo nuevas células se descargan a la circulación en pocos minutos (Houston et al., 1996). En caso de estrés por hipoxia se suelen observar células circulantes en división (Murad et al., 1993). Las alteraciones del ambiente también impactan en el sistema inmune de los peces y consecuentemente afectan a su resistencia a las enfermedades (Cuesta et al., 2011).

La aplicación de técnicas hematológicas ha resultado de utilidad en el ámbito de la biología pesquera a la hora de diagnosticar la salud de los peces (Blaxhall, 1972) y evaluar las respuestas frente al estrés (Soivio y Oikari, 1976), incluidas las debidas a concentraciones subletales de contaminantes (McKim et al., 1970; Iwama et al., 1976). De esta manera, el uso de técnicas hematológicas ha ido ganando importancia en las investigaciones toxicológicas y de monitoreo ambiental (Rey Vázquez y Lo Nostro, 2014). Distintos estudios han utilizado a la hematología como biomarcador de exposición a plaguicidas (Girón-Pérez et al., 2008; Velisek et al., 2009; Modesto y Martinez, 2010), a metales (Vosylienė, 1996a, 1996b; Witeska, 2005; Hoyle et al., 2007) y otros agentes estresantes (déficit nutricional, manejo en criaderos, agentes infecciosos y ambientales) (Vosylienė y Kazlauskienė, 1999; Clauss et al., 2008).

Biomarcadores isotópicos

Las relaciones de isótopos naturales estables de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o $\delta^{13}\text{C}$), nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ o $\delta^{15}\text{N}$), azufre ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ o $\delta^{34}\text{S}$), hidrógeno ($^2\text{H}/^1\text{H}$ o δH) y oxígeno ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ o $\delta^{18}\text{O}$) se han convertido en herramientas de gran utilidad y popularidad para rastrear las fuentes de materia orgánica en los ecosistemas (Jardine et al., 2006).

En particular, los análisis de relaciones isotópicas estables de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ son una herramienta muy útil para rastrear los hábitos alimentarios de los organismos (Banas et al., 2009). La diferencia en $\delta^{15}\text{N}$ entre el consumidor y su presa se conoce como $\Delta^{15}\text{N}$. El nitrógeno en la proteína de los consumidores generalmente está enriquecido en ^{15}N en un 3–5‰ en relación con el nitrógeno de la presa (es decir, $\Delta^{15}\text{N} = 3\text{--}5\text{‰}$). Este enriquecimiento de isótopos pesados de nitrógeno parece ser causado por el fraccionamiento isotópico que ocurre con la transaminación durante el catabolismo de proteínas (Doucett et al., 1999). Este aumento permite determinar el nivel trófico de un animal en una red trófica (DeNiro y Epstein, 1981; Post, 2002). A menudo, la similitud isotópica relativa de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ entre la dieta y el consumidor ($\Delta^{13}\text{C} = 0\text{--}1\text{‰}$; DeNiro y Epstein, 1978; Post, 2002) permite identificar la fuente de la dieta de un animal (Jardine et al., 2005).

En el campo de la ecotoxicología, los análisis de isótopos estables son utilizados con mayor frecuencia para dilucidar el comportamiento de los contaminantes (bioconcentración y biomagnificación) a través de las redes tróficas (Borga et al., 2001; Binelli y Provini, 2003; McIntyre y Beauchamp, 2007). Sin embargo, otras aplicaciones como biomarcadores han surgido a lo largo de los años.

Estudios sobre fisiología vegetal han proporcionado evidencia de cambios en el enriquecimiento de $\delta^{15}\text{N}$ en tejidos vegetales debido a factores de estrés ambiental. El enriquecimiento en ^{15}N en agujas de la píceo Noruega (*Picea abies*) de un bosque en declive se atribuyó al inicio del “catabolismo y reasignación de nitrógeno” (Gebauer y Schulze, 1991). Bajo la exposición al ozono, las plantas de trigo común (*Triticum aestivum*) muestran un aumento en $\delta^{15}\text{N}$ (Hofmann et al., 1997). En animales, Shaw-Allen et al. (2005) hallaron que los hígados de la garza *Egretta thula*, alimentadas con dietas contaminadas con mercurio, mostraron una mayor $\delta^{15}\text{N}$, mientras que el músculo de esas aves mostró una $\delta^{15}\text{N}$ más baja en comparación con las aves alimentadas con dietas control. Los autores sugirieron entonces la utilización de la variación de $\delta^{15}\text{N}$ como un biomarcador de estrés químico, entre otras cosas, debido a que los efectos se observaron con concentraciones de contaminantes más bajas que las que inducen respuestas con otros biomarcadores convencionales como las metalotioneínas y el glutatión.

En los peces aún son escasos los trabajos que utilizan los análisis isotópicos como un biomarcador de estrés químico (Banas et al., 2009; Jardine et al., 2006). En los peces, los análisis de isótopos estables generalmente se realizan sobre el músculo blanco (Banas et al., 2009). Es sabido que la movilización, reorganización y catabolismo de las reservas de lípidos y proteínas almacenadas en el músculo, que ocurren durante la inanición, aumentan el enriquecimiento isotópico en los tejidos (Doucett et al., 1999). Por lo tanto, estudiar las relaciones isotópicas frente a contaminantes con potenciales efectos en el metabolismo de músculo, lípidos y proteínas puede aportar nuevas evidencias ecotoxicológicas desde el punto de vista bioenergético.

Los biomarcadores y el efecto de la escala: enfoque multinivel o de respuesta múltiple

Dado que los efectos de las sustancias contaminantes en los organismos pueden manifestarse en uno o varios niveles diferentes de organización biológica, un biomarcador único y aislado no es suficiente para reflejar el estado de salud de un organismo, por lo que utilizar una gran batería de biomarcadores de diferentes niveles de organización es más apropiado para evaluar los efectos toxicológicos de los xenobióticos (Adams et al., 1989; Beliaeff y Burgeot, 2002). El “Concepto de Respuesta Múltiple” (Depledge, 1994), que recomienda estudiar y vincular biomarcadores en diferentes niveles de organismos y suborganismos, sigue siendo relevante y debe aplicarse en la investigación ecotoxicológica siempre que sea posible. Este enfoque implica medir un conjunto de respuestas al estrés seleccionadas en cada uno de varios niveles de organización biológica para evaluar los efectos del estrés subletal en los peces, servir como señales de alerta temprana de estrés y obtener información sobre las relaciones causales entre los factores estresantes y los efectos que se manifiestan en niveles más altos de organización biológica (Adams et al., 1989). Los tipos de respuestas al estrés medidos con este enfoque van desde los niveles biomolecular/bioquímico hasta la población y la comunidad y se segregan a lo largo de gradientes tanto de relevancia toxicológica y ecológica como de tiempo de respuesta (Figura 29). Los biomarcadores que reflejan el estado de salud de los peces en los niveles de organización más bajos responden con relativa rapidez al estrés y tienen una gran relevancia toxicológica; aquellos que reflejan condiciones de salud en niveles de organización más altos responden lentamente al estrés y tienen menor relevancia toxicológica, pero son más relevantes ecológicamente (Adams et al., 1989).

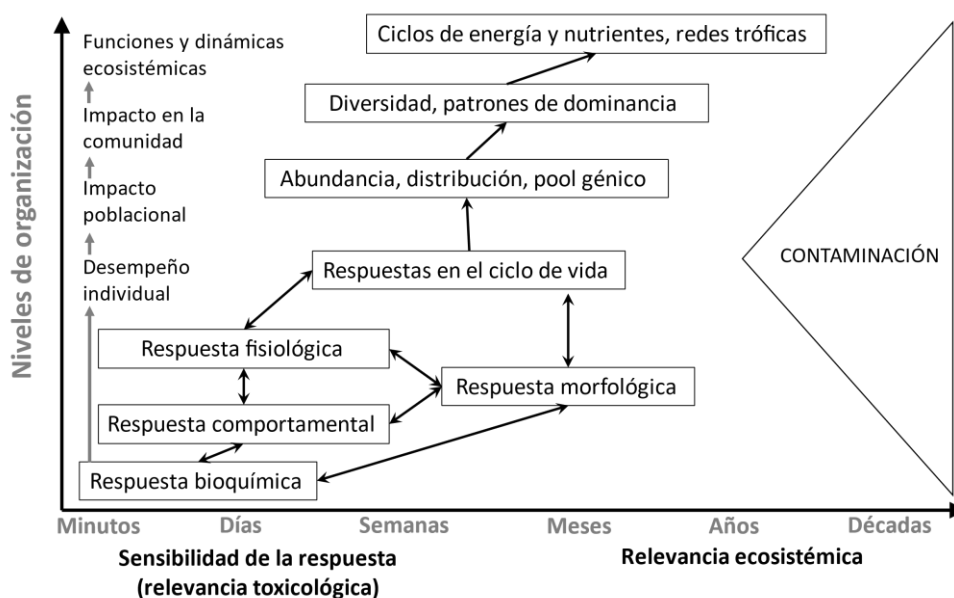


Figura 29- Niveles de respuesta biológica al estrés por contaminantes en los diferentes niveles de organización biológica ilustrando la continuidad de estas respuestas a lo largo de gradientes de tiempo de respuesta y relevancia toxicológica y ecológica (modificado de Adams et al., 1989 y Gerhardt, 2007).

Por ejemplo, mientras los biomarcadores de estrés oxidativo e isotópicos forman parte de los niveles más bajos de organización biológica, los biomarcadores histopatológicos presentan una localización intermedia (Adams et al., 1989). Los cambios histológicos se observan a mediana escala de tiempo en respuesta a factores de estrés subletales (Johnson et al., 1993). Por otro lado, el comportamiento es la reacción visible de un organismo frente a un estímulo ambiental a nivel de organización del individuo (Gerhardt, 2007). Al presentar una importante componente bioquímica y, a su vez, tener consecuencias en la población, el comportamiento puede considerarse como un biomarcador altamente integrador (Little, 1990; Janssen et al., 1993; Dell'Omo, 2002), debido a su transversalidad entre los diferentes niveles de organización.

Este enfoque multiescalar, incluyendo el análisis de varios niveles de organización biológica, será el aplicado en el presente capítulo y será el hilo conductor con el capítulo 3.

El valor de los peces como bioindicadores de contaminación

Los peces constituyen algo más de la mitad del total de especies de vertebrados vivientes, al mismo tiempo representan la clase de vertebrados más diversa con unas 35.000 especies descritas hasta el momento (Froese y Pauly, 2022). Esta diversidad taxonómica se refleja en una diversidad de formas corporales, estilos de vida y fisiología que también reflejan la gran diversidad de los sistemas acuáticos que habitan estos organismos (Rand, 2008). Al mismo tiempo, los peces son un recurso valioso para el hombre, representan un elemento importante en la economía de muchos países ya que las pesquerías comerciales no son sólo

importantes para países industrializados sino también para aquellos en vías de desarrollo (Nagel e Isberner, 1998).

Los peces son uno de los grupos más utilizados como indicadores de contaminación en estudios ecotoxicológicos (Hartl, 2002; van der Oost et al., 2003; Rand, 2008; Cazenave et al., 2009). De acuerdo con Markert (1994) un bioindicador es un organismo (o una parte de un organismo o una comunidad de organismos) que contiene información sobre la calidad del medio ambiente. Los peces poseen una serie de ventajas en cuanto a su conocimiento básico e integral en el área de la toxicología, fisiología e histología. Estos organismos acuáticos presentan una mayor facilidad en cuanto a la aplicación de métodos diferentes que permiten evaluar la severidad de los impactos de los contaminantes, desde respuestas compensatorias a nivel molecular y ultraestructural (sirviendo como indicador de alerta temprana) hasta cambios subletales y patológicos como señales de alarma y con potenciales efectos en la población y consecuencias irreversibles para todo el ecosistema (Chovanec et al., 2003). Algunos biomarcadores son indicadores de estrés inespecífico, otros responden a un grupo de sustancias tóxicas con atributos comparables y sólo unos pocos biomarcadores son muy específicos de la sustancia. Debido a sus complejos requisitos de hábitat, los peces constituyen un indicador crucial de la integridad ecológica de los sistemas acuáticos a diferentes escalas, desde el microhábitat hasta la cuenca. La aptitud de las especies de peces tanto a nivel individual (p. ej., rendimiento del crecimiento) como a nivel de población (p. ej., estructura de la población) está determinada por la conectividad de diferentes elementos del hábitat en un amplio contexto espacio-temporal (Chovanec et al., 2003). Por lo tanto, los peces utilizados como bioindicadores representan una buena herramienta de seguimiento, monitoreo y evaluación de la contaminación en la gestión de cuerpos de agua.

Metodología

Obtención de los ejemplares

Especie: *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)

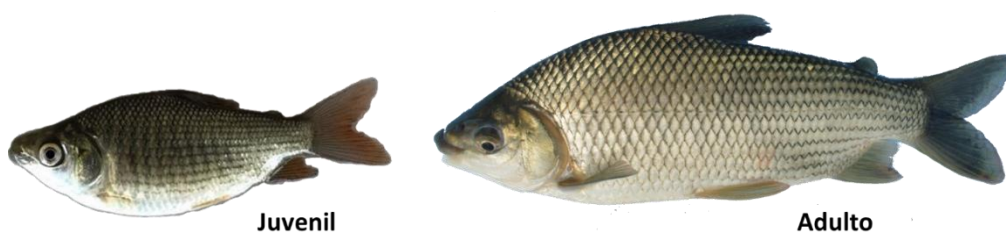


Figura 30- Juvenil de sábalo (Long. Estándar= 5 cm) y adulto (Long. Estándar = 35 cm).

Los ejemplares utilizados provinieron de desoves inducidos en la estación de acuicultura del Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE), Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE, Argentina) y de la empresa piscicultora “Pez Campero”.

En todos los casos, los peces fueron recibidos en nuestro laboratorio con una edad de entre 2 y 30 días post fecundación. Durante los primeros días de desarrollo y hasta la reabsorción total del vitelo, las larvas y postlarvas fueron alimentadas con huevos decapsulados y larvas *nauplii* de *Artemia* sp. hasta alcanzar el estadio juvenil (Figura 30) en condiciones de bioterio (Figura 31).



Figura 31- Sábalo aclimatados en acuarios del Lab. de Ecotoxicología Acuática en el bioterio central de la FCEyN.

A continuación, se presentan los procedimientos generales y los diseños experimentales que se llevaron a cabo a lo largo de la tesis. En las secciones correspondientes se detallará el diseño empleado en cada uno de los ensayos, así como los biomarcadores evaluados y las técnicas empleadas en las determinaciones analíticas en las distintas matrices.

Se realizaron cuatro tipos diferentes de bioensayos de exposición: 1) toxicidad letal aguda en agua, 2) exposición *ex vivo*, 3) toxicidad subletal subcrónica en agua y 4) toxicidad subletal subcrónica en agua y sedimentos fortificados.

Estabilidad de la ivermectina en condiciones experimentales

Previo a la realización de los bioensayos de exposición de IVM en agua, se estudió la cinética de la IVM en agua en las condiciones experimentales (decaimiento). Para ello, se dispusieron tres acuarios experimentales con 6 L de agua declorada a 25-26 °C con aireación constante y un fotoperíodo de 12/12. A dos de los acuarios se les adicionó una alícuota de solución madre de IVM en metanol hasta alcanzar una concentración final en cada acuario de 0,5 y 0,05 mg/L. Luego del adicionado de las alícuotas, los acuarios fueron homogenizados y se tomaron dos muestras de 200 ml de agua de cada acuario. Otras dos muestras de 200 ml de agua fueron tomadas de cada acuario a las 24, 48 y 72 h de inicio del ensayo de decaimiento

(Figura 32). Las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio ámbar y procesadas en el mismo día en los laboratorios del departamento de Química Analítica, Gerencia Química de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), bajo la coordinación de la Dra. Paola Babay.

Para ello, las muestras se concentraron mediante extracción en fase sólida (SPE) en cartuchos Hypersep C18 (Thermo Scientific, EE. UU.), seguido de elución con metanol antes de la inyección en HPLC. La concentración de IVM se midió mediante HPLC de fase inversa acoplada a detector UV (Accela, Thermo Scientific, EE. UU.) de acuerdo a Shurbaji et al. (2010). La columna empleada fue una Kinetex C18 100A - 100 mm × 4,6 mm, tamaño de partícula de 2,6 µm (Phenomenex, EE. UU.). La fase móvil estaba compuesta por 56 % de acetonitrilo/36 % de metanol/7,5 % de agua, con 0,5 % de ácido acético. La elución se realizó con un caudal de 1 ml/min. El detector se fijó a 245 nm. Para la cuantificación, se construyeron curvas de calibración para las áreas de los picos, a partir de la inyección de soluciones estándar preparadas diariamente agregando cantidades conocidas de IVM al agua de control y procesadas de la misma manera que las muestras. Para cada conjunto de muestras duplicadas, se calcularon las desviaciones media y estándar después de la interpolación del área del pico cromatográfico IVM en la curva de calibración ($R^2=0,99$) (ver Anexo 1 para información más detallada).

Con la información obtenida de la concentración de IVM a lo largo del tiempo se estableció el tiempo de recambio total del medio que asegure mantener estable la concentración de IVM a lo largo de los bioensayos.

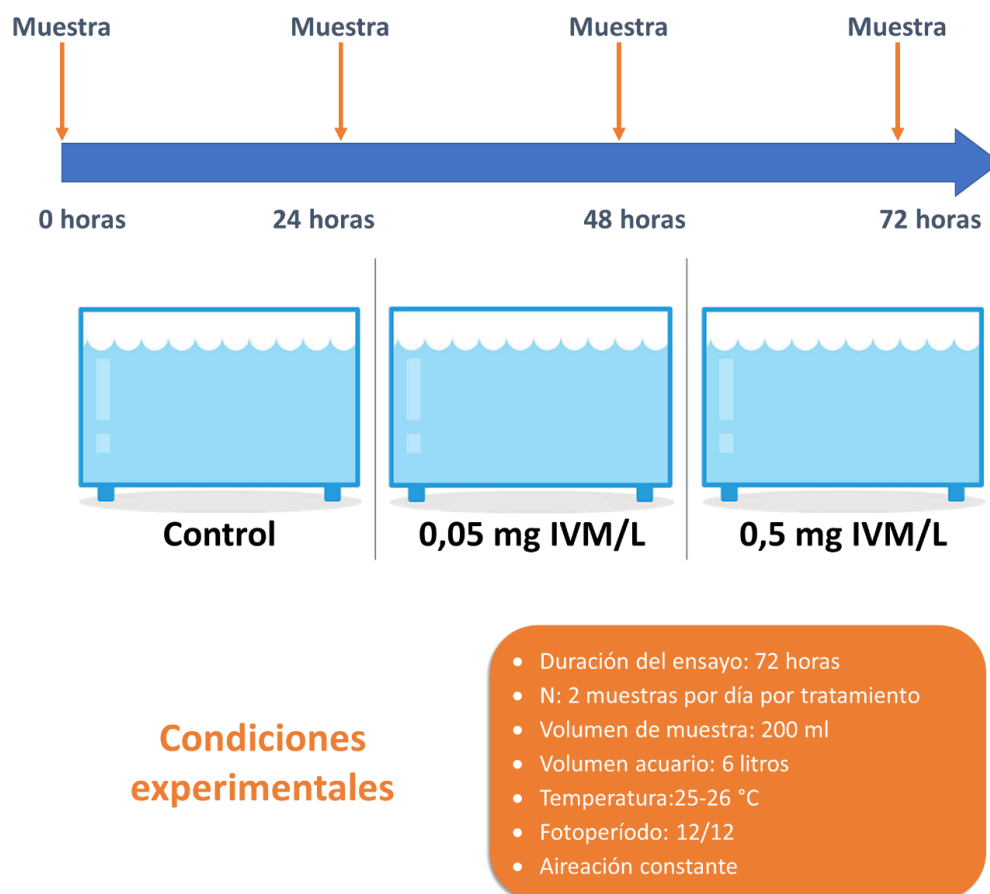


Figura 32- Diseño experimental del ensayo de caída de IVM en condiciones experimentales.

Aclimatación de los ejemplares

Los peces utilizados en cada ensayo fueron seleccionados al azar y sometidos a un período de aclimatación de al menos una semana en condiciones de laboratorio con temperatura y fotoperíodo acordes a las condiciones del ensayo posterior (Figura 33). Durante este período se suministró diariamente alimento comercial Otohime B1 (contenido proteico 51%, grasas 11%, fibra 3%, Marubeni Nisshin Feed, Japón).



Figura 33- Juveniles de sábalo aclimatándose en acuarios experimentales previo al inicio de bioensayo.

1) Toxicidad letal aguda de la ivermectina en agua

Se evaluó la toxicidad letal aguda de la IVM siguiendo el protocolo *Fish, Acute Toxicity Testing, Test Guideline No. 203* (OECD, 2019). Los peces fueron expuestos a concentraciones crecientes de IVM durante un período de 48 horas, en condiciones semiestáticas (recambio total del medio diario) en acuarios de 1 litro con agua dechlorada (Figura 34). Los ejemplares utilizados fueron postlarvas de 22 días de vida postdesove (Long. Estándar=8,67±0,95 mm). Dada la hidrofobicidad de la IVM se utilizó como vehículo metanol, por lo que la toxicidad del vehículo también fue evaluada.

La solución madre de IVM (500 mg/L) se preparó disolviendo 0,1250 g de IVM (99,8%, Saporiti, Argentina) en 250,00 mL de metanol (p.a., 99,8%, Biopack). Se prepararon diluciones a partir de la solución madre hasta alcanzar el volumen final de cada acuario. Las diferencias en la concentración del vehículo entre tratamientos fueron compensadas con el agregado de metanol hasta obtener una concentración de final de 0,01 %v/v en todos los tratamientos.

Hacia el final del ensayo, se registraron las mortalidades y las anomalías visibles relacionadas como la apariencia y el comportamiento. Se determinó finalmente las concentraciones que provocaron la mortalidad del 50% de los peces expuestos (CL₅₀) con la metodología PriProbit (Sakuma, 1998), la concentración de efectos no observables (NOEC) y la concentración más baja de efectos observables (LOEC).

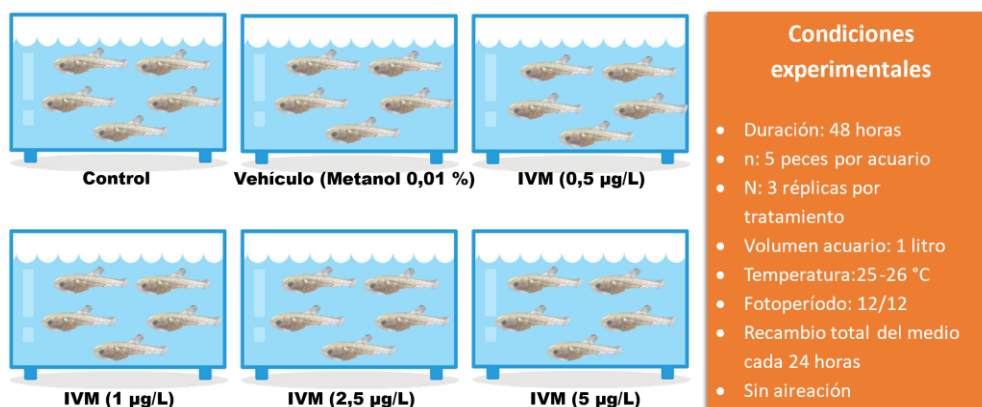


Figura 34- Esquema del diseño y tratamientos empleados en el ensayo de toxicidad letal aguda de la IVM en agua.

2) Exposición *ex vivo* de branquias

La exposición de branquias se llevó a cabo en base a la metodología descrita para peces de agua dulce por Britto et al. (2012), con modificaciones propuestas por Santillán Deiú et al. (2021a). Este tipo de ensayo de corta duración funciona como una herramienta preliminar para la evaluación toxicológica y un primer acercamiento a los efectos bioquímicos de los contaminantes como la IVM. Los juveniles de sábalo (Long. Estándar= $6,7 \pm 0,3$ cm; Peso= $5,9 \pm 0,6$ g) fueron sedados por criosedación en baño de agua y hielo y sacrificados por decapitación. Inmediatamente se extrajeron los arcos branquiales y se colocaron 4 hemibranquias en cada vial de incubación, los cuales contenían 20 ml de una solución salina para peces de agua dulce (Santillán Deiú et al., 2021a) compuesta por: 125 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 0.94 mM MgSO_4 ; 30 mM NaHCO_3 ; 1 mM NaH_2PO_4 ; 1.25 mM CaCl_2 ; 10 mM glucosa, a pH 7.4. Además de la solución de incubación, cada vial fue asignado al azar a cada uno de los tratamientos: Control, Control de vehículo (0,01 % v/v de metanol), IVM 1 (5 µg/L), IVM 2 (50 µg/L) y IVM 3 (500 µg/L). El diseño experimental se detalla en la Figura 35.

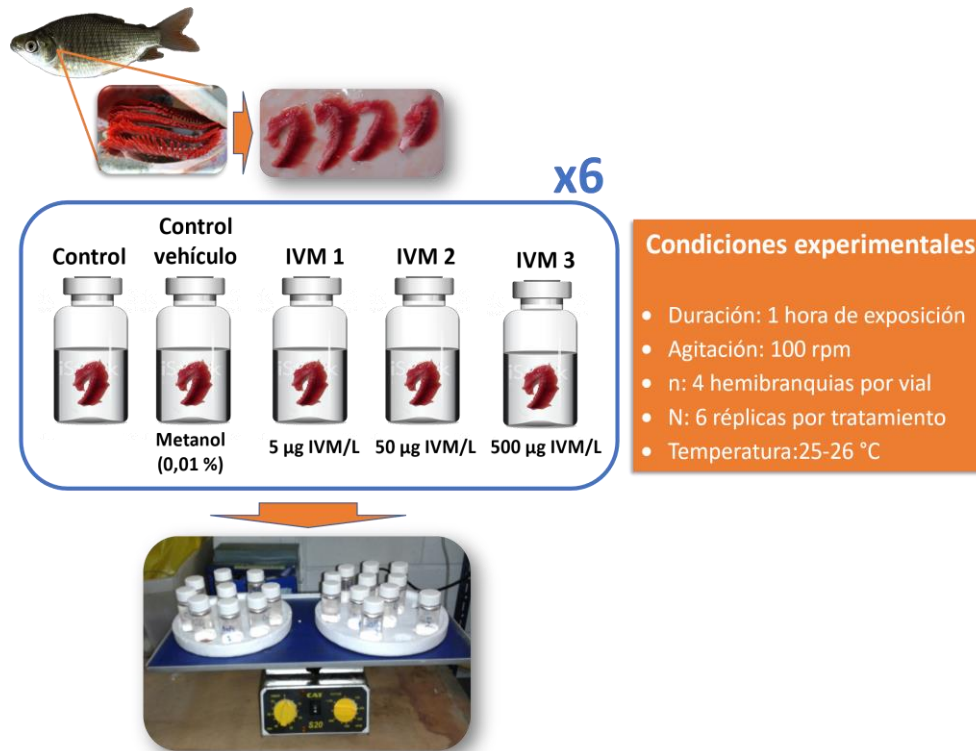


Figura 35- Esquema del diseño experimental *ex vivo* con branquias de *Prochilodus lineatus*.

El tiempo total de exposición fue de 1 hora, a 25 ± 1 °C y con agitación constante a 100 rpm. Todas las soluciones (solución de incubación y de IVM) se prepararon en el día, al momento previo de iniciar el ensayo, y la exposición al tratamiento correspondiente fue inmediata a la disección de las branquias. Pasado el tiempo de exposición, las branquias fueron retiradas cuidadosamente, secadas en papel absorbente y almacenadas a -80 °C en tubos Eppendorf hasta la posterior evaluación de biomarcadores. El ensayo constó de 6 réplicas por tratamiento.

3) Toxicidad subletal subcrónica de la ivermectina en agua

Juveniles de *P. lineatus* (N=24; $5,39 \pm 0,90$ cm de longitud estándar; $4,60 \pm 2,34$ g de peso total) fueron expuestos individualmente a concentraciones nominales de IVM de 0 (control), 0,5 µg/L y 1,5 µg/L durante 15 y 30 días en acuarios de 6 L (figura 36). También se realizó en paralelo un tratamiento control del vehículo (metanol 0,001% v/v). Las concentraciones experimentales se seleccionaron en función de las concentraciones ambientales previamente reportadas (Mesa et al., 2020; Kövecses y Marcogliese, 2005) y por debajo del valor CL_{50} obtenido previamente para postlarvas (ver ensayo Toxicidad letal aguda de la ivermectina en agua).

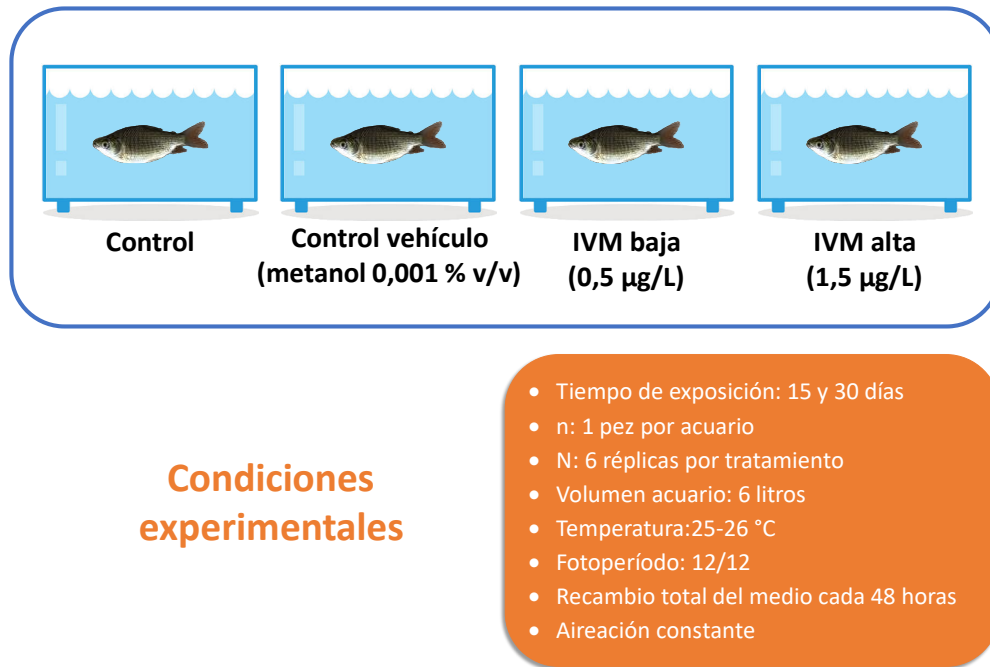


Figura 36- Esquema del diseño experimental de Toxicidad subletal subcrónica de la IVM en agua.

Con el fin de facilitar la captura de imágenes para la evaluación comportamental y disminuir el contacto visual de los peces entre los tratamientos, las paredes de los acuarios fueron cubiertas con papel adhesivo blanco opaco (Figura 37). El ensayo fue semi-estático, con renovación total del medio de los tratamientos y los controles cada 48 h. Los peces fueron alimentados con Otohime B1 (contenido proteico 51%, grasas 11%, fibra 3%, Marubeni Nisshin Feed, Japón). *ad libitum* una vez por día por la mañana (aproximadamente 10:00 AM). Al finalizar el ensayo, los acuarios fueron filmados frontalmente para los análisis comportamentales. A continuación, los peces fueron anestesiados por criosedación en baño de agua y hielo, medidos, pesados y se les extrajeron las muestras de sangre a través de punción del pedúnculo caudal. Luego, se sacrificaron por decapitación para la extracción del hígado, branquias, encéfalo y músculo. Las determinaciones hematológicas se realizaron en el momento, y los restantes tejidos fueron almacenados a -80 °C hasta su posterior procesamiento. En el caso de las branquias, se conservó la mitad del aparato branquial (4 hemibranquias, lado derecho) de cada pez en fijador de Bouin por 24 h seguido de un enjuague con agua destilada y posterior almacenamiento en etanol 70 % v/v hasta el procesamiento histológico.



Figura 37- Disposición de acuarios experimentales con laterales y fondo blancos.

4) Toxicidad subletal subcrónica en agua y sedimentos fortificados

En este ensayo se evaluó el efecto producido por la exposición a sedimentos fortificados (del inglés *spiked*) con dos concentraciones ambientales de IVM en juveniles de sábalo.

Para realizar este experimento se obtuvo sedimento superficial de un humedal de bajo impacto antrópico ubicado en el arroyo Las Flores (Luján, provincia de Buenos Aires, Argentina). El sedimento de este sitio ha sido utilizado previamente por otros autores (Santillán Deiú et al., 2021b; Scarcia et al., 2014; Peluso et al., 2013). En el laboratorio, los restos de hojarasca y macrofauna fueron removidos manualmente y el sedimento fue secado a temperatura ambiente. Posteriormente, el sedimento seco fue finamente molido y tamizado con una malla de 1190 μm de apertura. El sedimento tamizado se colocó en recipientes de vidrio ámbar y se asignó a uno de tres tratamientos: sedimentos de control y sedimentos fortificados con 2 μg de IVM/kg (IVM baja) y 20 μg de IVM/kg (IVM alta). Los sedimentos fortificados se prepararon en

un mortero de vidrio mezclando el estándar analítico de ivermectina (99,8%, Saporiti, Argentina) disuelto en etanol con un inóculo inicial de sedimento y, luego de homogeneizado, se transfirió a recipientes de vidrio color ámbar (Figura 38). Este procedimiento se repitió hasta que se fortificó todo el sedimento de cada tratamiento. El contenido de carbono orgánico del sedimento fue de alrededor del 5% y la composición del sedimento fue caracterizada previamente por Scarcia et al. (2014) con la siguiente distribución granulométrica: arena 61%, arcilla 12% y limo 27%. Las concentraciones evaluadas (IVM baja y alta) se seleccionaron considerando los niveles máximos informados en el medio ambiente (Mesa et al., 2020).

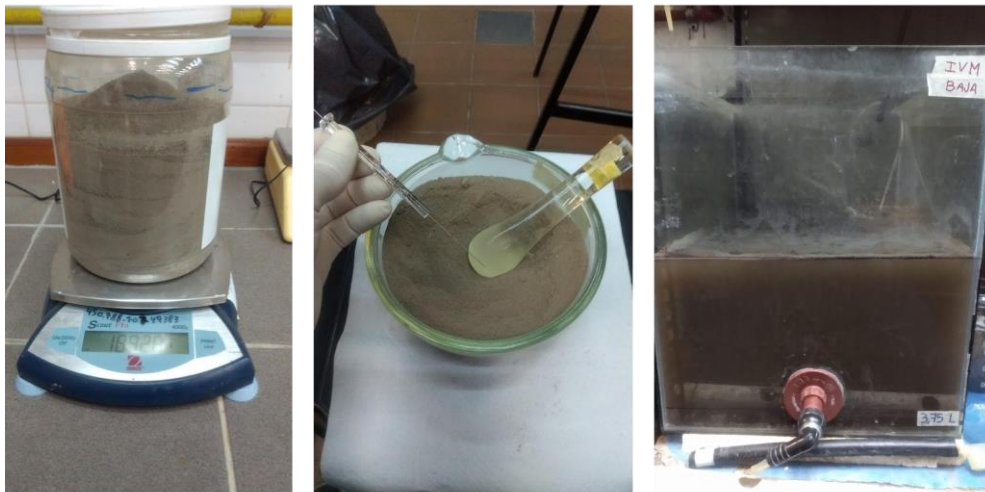


Figura 38- Fotografías del proceso de fortificado de sedimento y armado final del acuario de exposición.

Posteriormente a la preparación de los sedimentos, se realizaron los bioensayos estáticos de exposición a sedimentos en acuarios de vidrio que contenían 44 L de agua de red no clorada y 6 kg de sedimento control (Control) o sedimento fortificado con ivermectina (IVM baja y IVM alta). Después de agregar el sedimento a los acuarios, se permitió que el sistema se estabilizara durante 24 h antes de agregar animales. Los peces se distribuyeron aleatoriamente a cada tratamiento experimental ($n = 8$ pseudoréplicas) y permanecieron expuestos durante 14 días bajo aireación y fotoperiodo constantes (12/12); no se suministró alimento durante el ensayo. En la figura 39 se presenta un esquema del diseño experimental. Para evaluar la partición de la IVM en los diferentes compartimentos ambientales (agua, sedimento y material particulado en suspensión), se realizó una prueba similar simultáneamente en acuarios sin peces para ambas concentraciones (IVM baja y IVM alta).

Los parámetros de calidad del agua, incluidos la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH y la conductividad, se monitorearon periódicamente con una sonda multiparamétrica Hanna HI 9812-5 (pH, temperatura y conductividad) y un oxímetro Hanna HI9147.

Para la cuantificación de IVM, se recolectaron muestras de agua (200 mL) y sedimento (15 g) de todos los tratamientos y acuarios a las 24 h (después de la estabilización del sistema) y 14 días (final del experimento). Las muestras de agua se pasaron a través de un filtro de nylon previamente pesado de 0,45 μm de poro para obtener la fracción de material particulado en suspensión (MPS). Las muestras de agua filtrada, MPS y sedimentos se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su cuantificación. Después de 14 días de exposición, los peces fueron anestesiados por criosedación en baño de agua y hielo ($1-2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y fueron medidos y pesados antes de la disección. Luego, se sacrificaron por decapitación para la extracción del hígado, branquias, encéfalo y músculo. Los órganos disectados fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

En el caso de las branquias, se conservó la mitad del aparato branquial (4 hemibranquias, lado derecho) de cada pez en fijador de Bouin por 24 h seguido de un enjuague con agua destilada y posterior almacenamiento en etanol 70 % v/v hasta el procesamiento histológico.

Debido a las dificultades logísticas en torno a la filmación de acuarios con una alta carga de sedimentos y elevada turbidez, no fueron evaluados parámetros asociados al comportamiento natatorio.

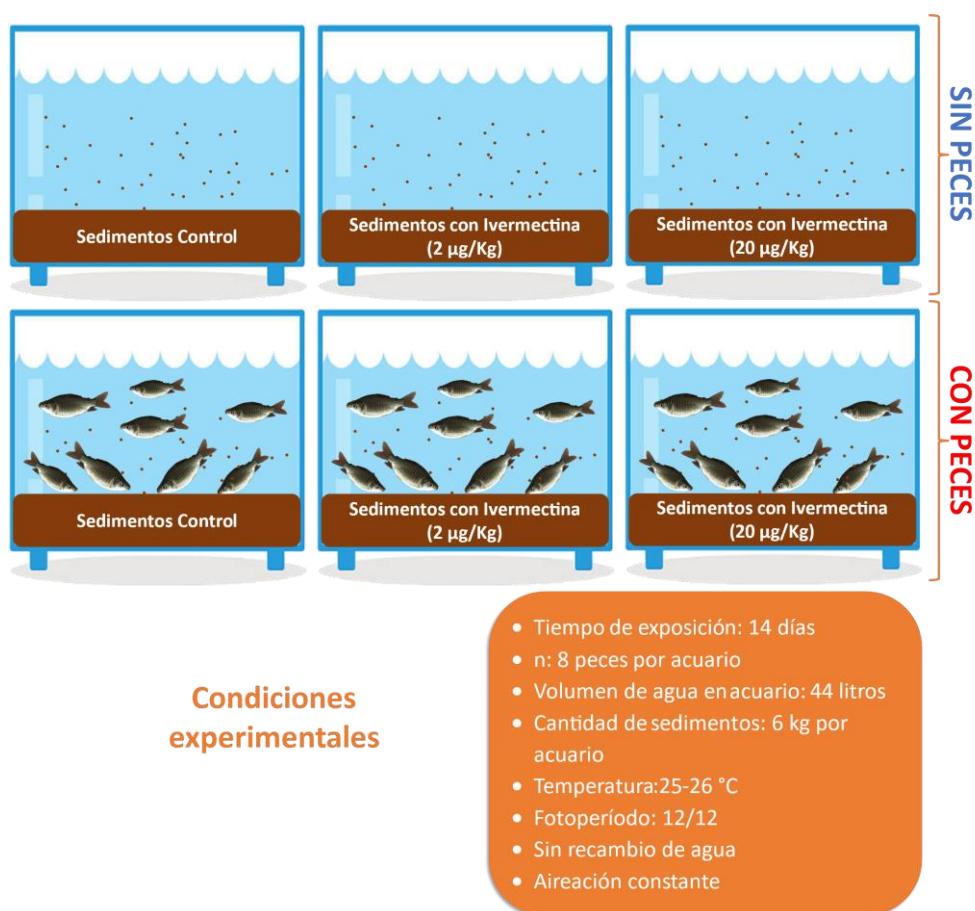


Figura 39- Esquema del diseño experimental del bioensayo de toxicidad subletal subcrónica en agua y sedimentos fortificados con IVM.

Biomarcadores evaluados

A continuación, se detalla la metodología de todos los biomarcadores evaluados en los distintos bioensayos agrupados por tipo y nivel de organización. Es importante mencionar que no todos los biomarcadores descriptos fueron evaluados en todos los bioensayos por igual.

Factor de condición

El factor de condición (FC) de los peces experimentales se estimó de acuerdo con Bagenal y Tesch (1978) a partir de la siguiente relación:

$$FC = \left(\frac{P}{L^a} \right) \times 100$$

Donde P: es el peso corporal del pez en gramos; L: longitud del pez en centímetros y a: el coeficiente isométrico obtenido de la ecuación longitud-peso de la especie previamente calculada por Llamazares Vegh et al. (2014).

Índice hepatosomático

Se evaluó el índice hepatosomático (IHS) de acuerdo con Sloof et al. (1983):

$$IHS = \left(\frac{PH}{P} \right) \times 100$$

Donde PH: es el peso del hígado en gramos y P: es el peso corporal del pez en gramos.

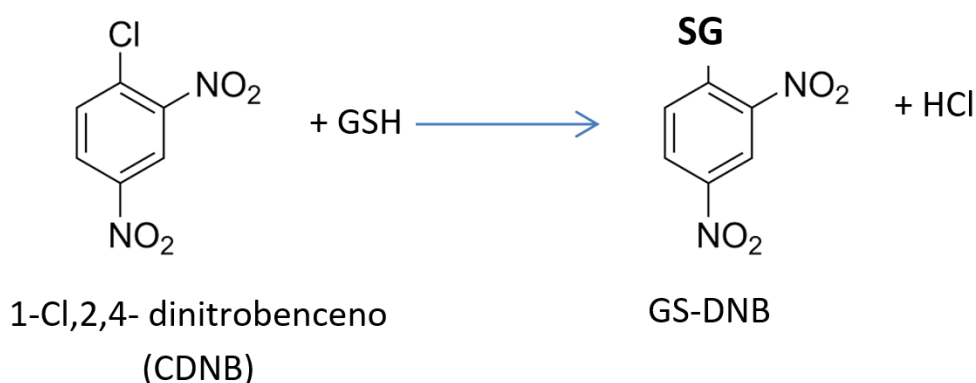
Biomarcadores bioquímicos de biotransformación y de estrés oxidativo

Las muestras de tejidos almacenadas a -80°C fueron homogeneizadas individualmente para obtener la fracción soluble libre de mitocondrias (FPM) con buffer PMS a pH=7,4 (0,1M NaH₂PO₄; 0,15M KCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 10% v/v glicerol) utilizando homogenizador de teflón hasta obtener desintegración total del tejido (Nilsen et al., 1998). Alícuotas del homogenato inicial se utilizaron para la cuantificación de los niveles de peroxidación lipídica. El resto de los homogenatos obtenidos se centrifugaron a 10000g durante 20 min, a 4 °C, se descartó el pellet y se separó la FPM para ser utilizada posteriormente en la determinación de los distintos biomarcadores bioquímicos. Las distintas alícuotas de la FPM fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Glutación-S-transferasa

Se determinó la actividad enzimática de la glutación-S-transferasa (GST) de acuerdo con Habig et al. (1974), utilizando como sustrato el 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB) el cual es

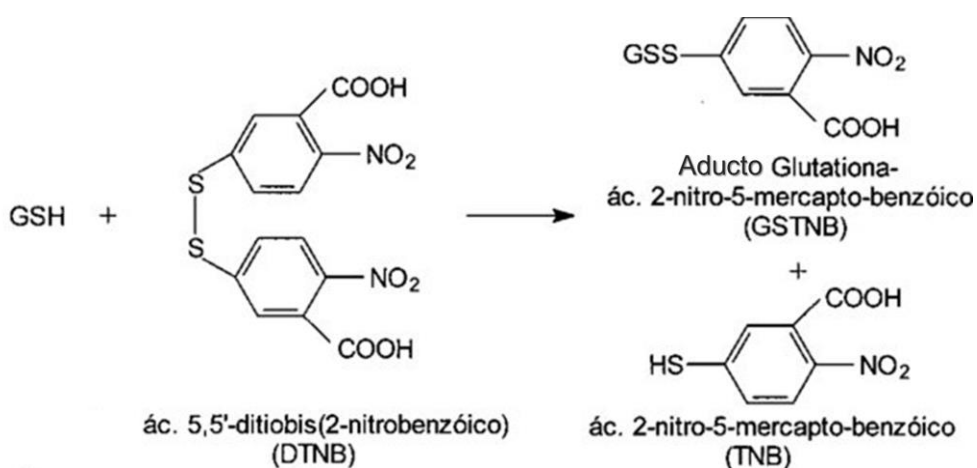
conjugado por las diferentes isoformas de la GST en presencia del glutatión reducido (GSH) formando GS-dinitrobenceno (GS-DNB) según la ecuación:



Las alícuotas de FPM fueron incubadas en buffer fosfato de sodio pH=6,5 (0,1 M) conteniendo 10 mM GSH y CDNB 20 mM. La formación de GS-DNB se cuantifica espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm. La actividad enzimática se expresó como nmoles de GS-DNB formados por minuto por mg de proteínas. El coeficiente de extinción molar utilizado fue $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Glutatión reducido

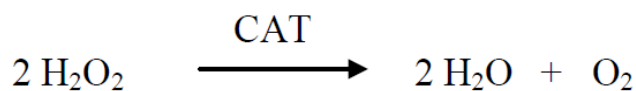
Se cuantificaron los niveles de glutatión reducido (GSH) de acuerdo con el protocolo de Ellman (1959). El grupo SH del GSH reacciona con el ácido Ditionitrobenzoico (DTNB) de la siguiente manera:



El producto TNB por ruptura del puente S-S en el DTNB se detecta con un máximo de Absorbancia a 412 nm. La concentración de GSH se calcula a partir de una curva de calibración con concentraciones conocidas de GSH estándar.

Catalasa

La actividad enzimática de la catalasa (CAT) se determinó siguiendo el método de Beutler (1982) el cual se basa en monitorear la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en el tiempo a una longitud de onda de 240 nm. La reacción que cataliza esta enzima es la siguiente:



Las alícuotas de FPM fueron incubadas a 30 °C en tampón para CAT a pH= 8 (Tris Base 1M+EDTA 5 mM) conteniendo H₂O₂ 2 mM, registrándose los cambios en la absorbancia cada 15 segundos durante 3 minutos. La actividad de la CAT fue expresada como μmoles de H₂O₂ consumidos por minuto por mg de proteínas totales. El coeficiente de extinción utilizado fue 0,071 mM⁻¹ cm⁻¹.

Peroxidación lipídica

Los niveles de peroxidación lipídica (LPO) fueron determinados por medio de la reacción del ácido tiobarbiturico (TBARS por las siglas en inglés *Thiobarbituric acid reactive substances*) con los productos finales de la peroxidación lipídica bajo condiciones de acidez y alta temperatura, generando un cromógeno que fue medido por fluorometría. Se siguió la metodología propuesta por Ohkawa et al. (1979) y Oakes y van der Kraak (2003). De esta forma se tomó una porción de tejido (hígado, encéfalo o branquias) se homogeneizó con buffer PMS (Nilsen et al., 1998) con un factor de dilución de 8 para encéfalo y 10 para branquias e hígado.

El homogenato diluido fue añadido a la mezcla de reacción conteniendo: 8,1% SDS; ácido acético 20% (pH=3,5); TBA 0,8% y 200 μl BHT, se incubó en un baño termostatzado a 95 °C durante 1h. Luego de enfriar los tubos se agregó agua MilliQ, n-butanol (99.4%) y se mezcló por inversión. Por último, se centrifugó a 2000 g durante 10 min, a 15 °C y se extrajo la fase orgánica. Sobre esta fase se evaluó por fluorometría la presencia del cromógeno con una longitud de onda de excitación de 515 nm y 553 nm de emisión. La concentración de los productos finales de la peroxidación lipídica fue expresada como nmoles TBARS por g de tejido y se usó tetramethoxypropane (TMP) como estándar externo.

Capacidad antioxidante frente a radicales peroxilos

La capacidad antioxidante frente a los radicales peroxilo (ACAP por las siglas en inglés *Antioxidant capacity againts peroxyradicals*) se evaluó de acuerdo con el protocolo propuesto por Amado et al. (2009). Esta metodología está basada en la detección de EROs por fluorometría

(ex/em: 485/520 nm) empleando como sustrato diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H_2DCF -DA). Las alícuotas de FPM de los diferentes órganos (branquias, hígado y encéfalo) se expusieron a radicales peroxilo generados por descomposición térmica ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$) de 2,2'-azobis (2 metilpropionamidina) diclorhidrato (ABAP, 4 mM). La capacidad antioxidante total contra los radicales peroxilo se estimó como la diferencia entre el contenido de EROs con y sin ABAP (Figura 40).

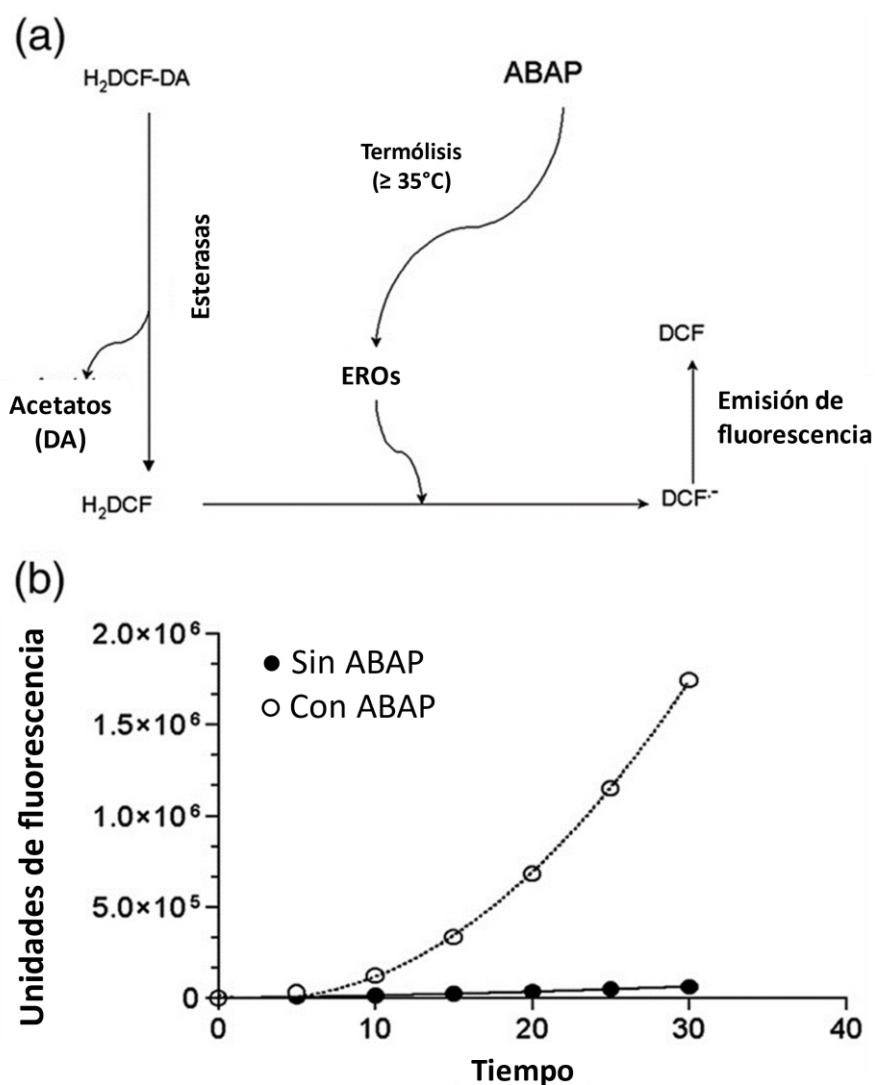


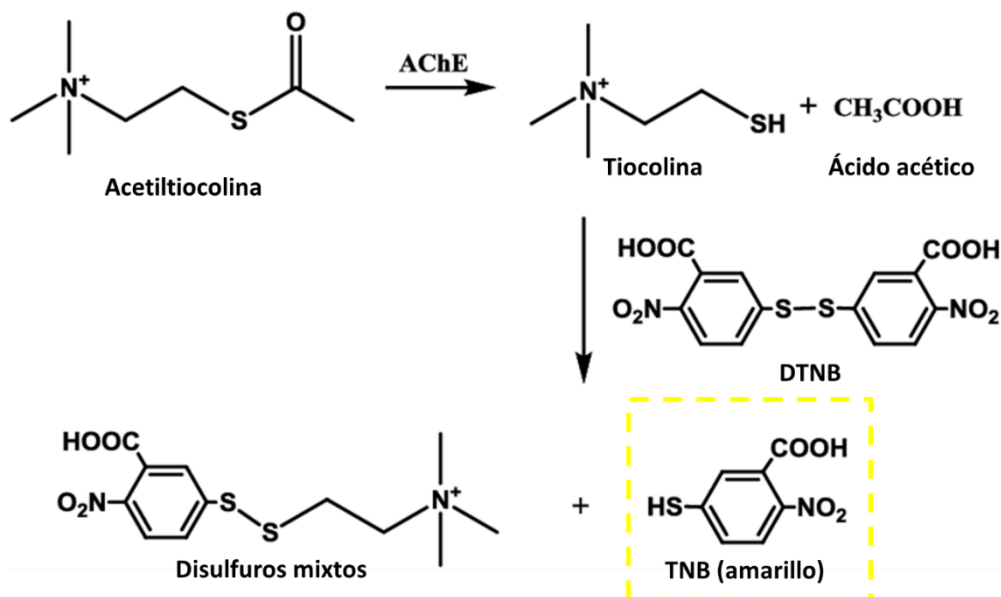
Figura 40- (a) Diagrama de flujo de la metodología empleada para la medición de la capacidad antioxidante frente a radicales peroxilo mediante la determinación de la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROs) en ausencia y presencia de ABAP (diclorhidrato de 2, 2'-azobis 2 metilpropionamidina). H_2DCF -DA: diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína. H_2DCF : 2',7'-diclorofluoresceína. DCF: H_2DCF oxidado. (b) Resultados de una ejecución típica que muestra registros de fluorescencia a lo largo del tiempo con y sin ABAP. (modificado de Amado et al., 2009).

Valores altos de fluorescencia relativa indican una baja capacidad antioxidante, ya que se obtuvieron altos niveles de fluorescencia después de agregar ABAP, lo que refleja una baja competencia para neutralizar los radicales peroxilo (Amado et al., 2009).

Biomarcadores bioquímicos de neurotoxicidad

Acetilcolinesterasa

La actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) se determinó en alícuotas de encéfalo y músculo de acuerdo con el protocolo de Ellman (1961) con algunas adaptaciones. La AChE hidroliza ésteres de colina (acetiltiocolina) en tiocolina, la cual reacciona con el reactivo de Ellman (DTNB) generando TNB mediante la siguiente reacción:



Las alícuotas de FPM de músculo y encéfalo fueron incubadas a 25 °C en buffer Fosfato de sodio 0,1 M (pH= 7,4) conteniendo reactivo de Ellman (DTNB, 0.01 M) registrándose los cambios en la absorbancia a 412 nm cada 30 segundos durante 2 minutos. La actividad de AChE fue expresada como nmoles de sustrato hidrolizados por minuto por mg de proteínas totales. El coeficiente de extinción utilizado fue 13,6 mM⁻¹cm⁻¹.

Concentración de proteínas en la fracción soluble libre de mitocondrias

El contenido de proteínas de la FPM de los órganos almacenados a -80 °C fue determinado por medio del método de Lowry et al. (1951) utilizando seroalbúmina bovina como estándar de referencia. El contenido de proteínas de cada FPM fue utilizado para expresar la actividad específica de las enzimas evaluadas.

Biomarcadores comportamentales

Al final de los bioensayos de exposición en agua, se analizó el comportamiento de natación grabando en video cada acuario durante 10 min (Figura 41) con una cámara Nikon 1 J2 a 24 fps.



Figura 41- Disposición de la cámara para la filmación frontal de los acuarios experimentales.

Los primeros 5 min se excluyeron del análisis porque se consideró un período de adaptación a la configuración de la cámara de video y el proceso de filmación. Cada acuario se marcó externamente en el cristal frontal a 3 alturas diferentes (inferior, media y superior) (Figura 42).



Figura 42- Vista frontal de un acuario experimental. En los laterales es posible ver las marcas que definen los estratos del acuario (inferior, medio y superior).

El tiempo de permanencia de cada pez en cada uno de los estratos del acuario se utilizó para calcular el tiempo de nado por estrato (uso de la columna de agua). También se estimó la velocidad de natación de rutina (NR) (Long. Estándar/s), la distancia total recorrida por cada pez (DTR) (m) y el tiempo total en actividad natatoria (TTA) (% del tiempo total y tiempo en segundos). Los análisis de video se realizaron con el software EthoVision XT (Noldus). La velocidad de natación de rutina se midió como la tasa media de desplazamiento de un pez individual durante una actividad sin disturbios y en ausencia de alimento (Fuiman et al., 1999).

Se estudió también la respuesta de escape frente a un estímulo visual mediante un video de alta velocidad (400 fps). El estímulo visual fue una tarjeta plástica blanca (10 × 25 cm) con un círculo negro (9 cm de diámetro) que se balanceó sobre el acuario y que generó una respuesta de escape en el pez. El círculo negro imita la silueta frontal de un depredador atacante. Se registró la velocidad máxima de nado (VMN en Long. Estándar/s) desarrollada durante la respuesta de escape. El análisis de video de alta velocidad se realizó con el software Tracker 5.1.5 (Brown, 2013).

Biomarcadores histológicos

Una vez removido el opérculo del lado derecho (en posición anatómica del animal, ver figura 35), se removieron los cuatros arcos y se los fijó en solución de Bouin por 24 h; posteriormente fueron transferidos a etanol 70 % v/v para su conservación. Posteriormente las piezas se deshidrataron en alcohol etílico de gradación creciente: 70°, 80°, 96°, 100° por 15 min cada. Luego se realizó un pasaje de 10 min. por xilol para aclaración, y se incluyeron en parafina Paraplast® (Fisherbrand, Fisher, Washington, E.E.U.U.; punto de fusión 56-58 °C) por 4 h. Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor en microtomo de rotación (Leitz Wetzlar 1212 Leica, Alemania). Las láminas se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados p.a. 0,1% (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE. UU.) para favorecer la adherencia y se colorearon con la coloración Tricrómica de Masson, Hematoxilina-Eosina o Azul Alcian (AB por las siglas en inglés, *Alcian Blue*) para detectar mucopolisacáridos ácidos; luego se procedió al montaje definitivo (DPX® Sigma) (ver Anexo 2 para más detalles de la metodología).

Los preparados obtenidos de esta forma se observaron con un microscopio Nikon Microphot FX en busca de alteraciones histopatológicas debidas a la exposición. Los cortes se fotografiaron utilizando una cámara digital Nikon Coolpix 5400 acoplada al microscopio.

Se identificaron cualitativamente histopatologías como ser alteraciones circulatorias producidas por los fluidos de la sangre y tejidos (ej. hemorragias, aneurismas); cambios regresivos que revelen disfunción del órgano/tejido (ej. atrofias, necrosis); cambios progresivos que indican aumento de la actividad celular (ej. hipertrofia, hiperplasia); procesos inflamatorios

asociados a otros patrones de reacción (ej. infiltraciones, tumores benignos o malignos) (modificado de Bernet et al. 1999).

Biomarcadores hematológicos

Al finalizar los ensayos de exposición en agua, aproximadamente 100-150 µL de sangre fueron obtenidos por punción del pedúnculo caudal con jeringa y aguja (27G 1/2) heparinizadas. Posteriormente las muestras de sangre fueron almacenadas en tubos Eppendorf previamente heparinizados hasta su procesamiento. Los análisis hematológicos se realizaron de acuerdo con Rey Vázquez y Guerrero (2007), con las modificaciones que se describen a continuación.

Medición de glucemia

Luego de la punción caudal, se obtuvo una primera gota de sangre para la medición de la glucosa utilizando una tira reactiva descartable (Accu-Chek® Performa, Roche). Esta medición de glucosa se basa en un sistema electroquímico que detecta corrientes eléctricas después de que la muestra de sangre reacciona químicamente con la tira reactiva. Cada una de las tiras reactivas poseen una variante mutante de la glucosa deshidrogenasa quinoproteica (Mut, Q-GDH) de *Acinetobacter calcoaceticus*, recombinante en *Escherichia. coli*, que convierte la glucosa presente en la muestra de sangre en gluconolactona. Esta reacción crea una corriente eléctrica continua que es censada por el equipo y utilizada para estimar la concentración de glucosa en sangre (Nuntapaitoon et al., 2019). La concentración de glucosa fue expresada en mg/dL.

El método utilizado fue inter calibrado en nuestro laboratorio con el método estándar de glicemia enzimática (Wiener Lab). En este método, la glucosa se determina luego de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) resultante reacciona bajo catálisis de la peroxidasa con fenol y 4-aminofenazona para producir una coloración de rojo-violeta quinoneimina que permite la cuantificación. Dado que se lograron cuantificaciones de glicemia similares entre ambos métodos, se prosiguió con las mediciones utilizando el kit rápido de Accu-Chek® Performa.

Recuento de glóbulos rojos

Dentro de las primeras 2 h después de la extracción de sangre, se realizó el recuento de glóbulos rojos (RGR) en cámara de Neubauer con el método propuesto por Natt-Herrick (1952).

Se escurrieron 5 µL de sangre en 1 ml de solución de Natt-Herricks. Se tapó el tubo y se mezcló la sangre diluida por 2 minutos. Luego se cargó la cámara de Neubauer con una micropipeta y se dejó reposar unos minutos hasta no observar movilidad de los eritrocitos. Se realizó el recuento en microscopio óptico como indica la figura 43.

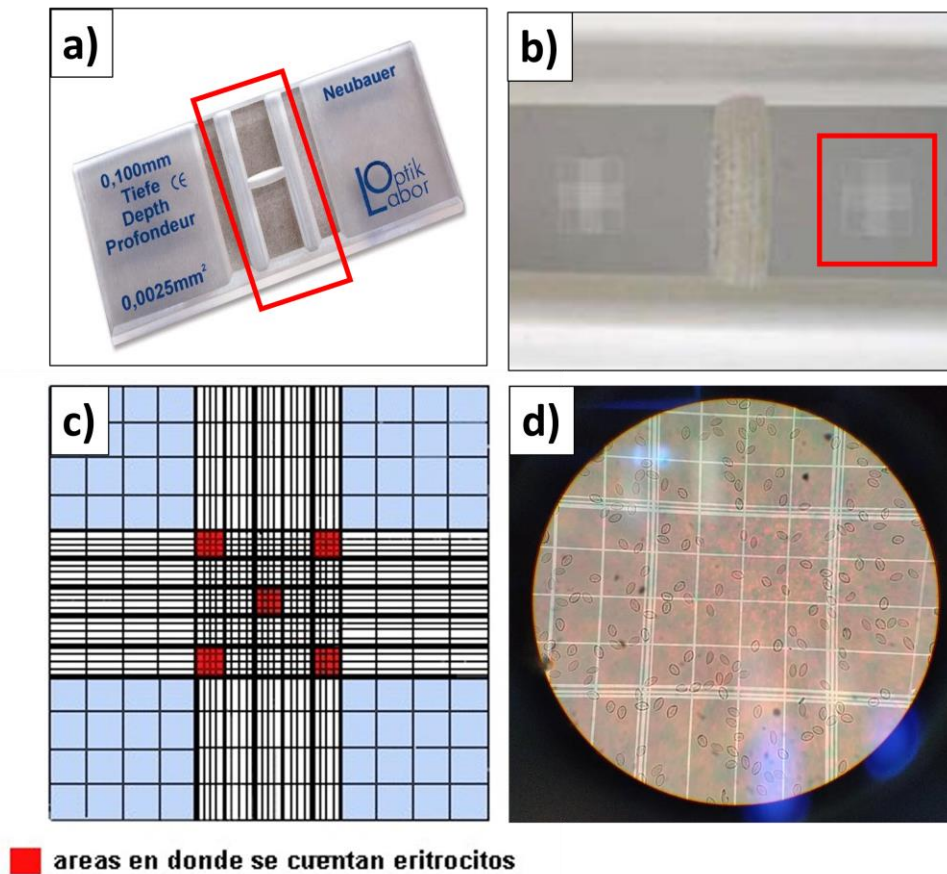


Figura 43- a) Vista frontal de cámara de Neubauer con la zona central marcada en rojo; b) Detalle en el que se observan los dos retículos grabados en la zona central c) Áreas de una de las dos grillas de una cámara de Neubauer donde debe realizarse el conteo de eritrocitos; d) detalle de la sección pequeña donde deben hacerse los conteos.

Se contabilizan los eritrocitos de cada área (5 áreas) y se suman. Luego se contabilizan los eritrocitos de la segunda grilla de la cámara. Las dos sumas de eritrocitos se promedian para realizar el siguiente cálculo:

$$RGR = \frac{\text{Eritrocitos}}{L} = N \times \frac{400}{80} \times 10 \times 200 \times 10^6$$

Donde N: eritrocitos contados en 80 de los 400 cuadrados pequeños; 10: factor de volumen; 200: factor de dilución.

Hematocrito

Los valores del hematocrito (Ht%) se determinaron a través del micrométodo. Se cargó un capilar heparinizado hasta unos 5 mm por debajo de su límite. Luego, el extremo inferior del capilar fue sellado con ayuda de masilla plástica. Los capilares fueron centrifugados a 1409 g durante 5 minutos. El hematocrito se calculó como la proporción porcentual que ocupan los glóbulos rojos en el total de la columna del capilar ocupado con plasma (Figura 44).

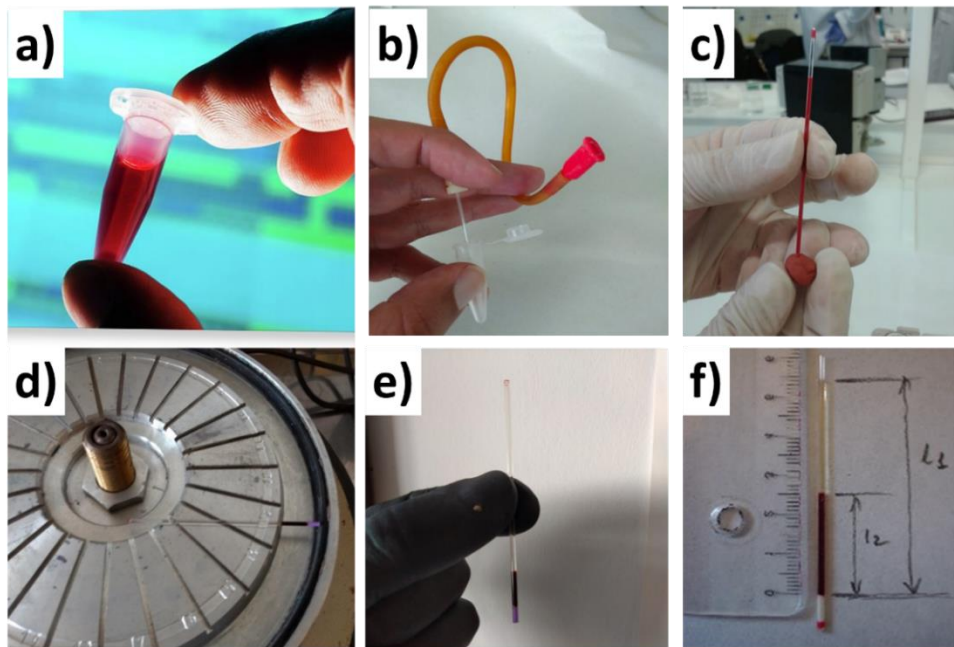


Figura 44- Políptico de los principales pasos para la estimación del hematocrito. a) Obtención de muestra en Eppendorf heparinizado; b) carga del capilar; c) sellado del capilar con masilla plástica; d) Centrifugación del capilar; e) obtención de la fracción celular y plasma post centrifugación; f) cálculo del hematocrito mediante la relación glóbulos rojos/plasma.

Concentración de hemoglobina

La concentración de hemoglobina se determinó utilizando el método de la cianometahemoglobina propuesto por Houston (1990). La hemoglobina presente en la muestra se oxida a metahemoglobina en presencia de ferricianuro que a su vez se combina con iones cianuro a pH 7,2 convirtiéndose en cianometahemoglobina, un compuesto muy estable. Su absorbancia se midió espectrofotométricamente a 540 nm (hemogloWiener reactive, Wiener Lab.) y es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina. Una alícuota de 10 µl de sangre se adicionó con micropipeta a 2,5 ml de reactivo hemolizante. Las muestras se centrifugaron para remover el material nuclear disperso. Luego se midió la absorbancia al espectrofotómetro contra el blanco del reactivo.

La Hb se obtiene del siguiente cálculo:

$$Hb_{muestra} = f \times (Absorbancia_{muestra} - Absorbancia_{blanco})$$

$$\text{Con el factor } f = \frac{Hb_{Est}}{(Absorbancia_{Est} - Absorbancia_{blanco})}$$

donde Hb_{Est} es la concentración en g/l de la hemoglobina correspondiente al lote de hemogloWiener Standard.

Índices hematimétricos

A partir de los parámetros sanguíneos obtenidos se calcularon, según Ranzani-Paiva et al. (2013), los siguientes índices hematimétricos:

- Hemoglobina corpuscular media (HCM):

$$HCM (pg) = \frac{Hb \times 10}{RGR}$$

- Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM):

$$CHCM(\%) = \frac{Hb \times 100}{Ht\%}$$

- Volumen corpuscular medio (VCM):

$$VCM(fL) = \frac{Ht\% \times 10}{RGR}$$

Biomarcadores isotópicos

Determinación de señales isotópicas de carbono y nitrógeno

Las muestras de músculo destinadas al análisis isotópico se secaron en un horno de laboratorio a 60°C durante 48 horas y fueron homogenizadas con un mortero. Cada muestra fue colocada en una cápsula pequeña de estaño y se utilizó 1 mg de peso seco para el análisis.

Las proporciones de isótopos estables de nitrógeno y carbono se determinaron mediante un espectrómetro de masas de flujo continuo (Thermo Scientific DELTA V Advantage acoplado vía la interfaz ConFlo IV a un Analizador Elemental Flash 2000). Las concentraciones elementales de carbono y nitrógeno ([C]% y [N]%) se midieron en el Laboratorio de Isótopos Estables en Ciencias Ambientales (UTN- FRSSR- CONICET). Las relaciones isotópicas se expresaron en notación delta estándar [δ valores (‰)] de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\delta X = \left[\left(\frac{R_{muestra}}{R_{estandar}} \right) - 1 \right] \times 1000$$

donde X es ^{13}C o ^{15}N y R la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ o $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de muestras o estándares internacionales (carbonato de piedra caliza belemnita Vienna Pee Dee, V-PDB, para carbono y aire atmosférico para nitrógeno). La precisión de medición fue <0,1 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. El $\delta^{15}\text{N}$ se calibró con respecto a las escalas AIR utilizando USGS40 y USGS41a y V-PDB para la calibración de $\delta^{13}\text{C}$. La incertidumbre de medición se determinó utilizando tres patrones internos: IRM-1 (cafeína IECA 17, $\delta^{13}\text{C}$ -33,02 ± 0,09 ‰, $\delta^{15}\text{N}$ -2,02 ± 0,1 ‰), IRM-2 (colágeno IECA 17, $\delta^{13}\text{C}$ -18,16 ± 0,9 ‰, $\delta^{15}\text{N}$ +11,07 ± 0,08 ‰) e IRM-3 (sacarosa, $\delta^{13}\text{C}$ -12,02 ± 0,09 ‰). La precisión para $\delta^{15}\text{N}$ y para $\delta^{13}\text{C}$ fue ± 0,08 ‰, ambas se determinaron mediante repetidas mediciones de los patrones de calibración, patrones de verificación y réplicas de muestra. La exactitud se estimó

en $\pm 0,11$ para $\delta^{15}\text{N}$ y $\pm 0,10$ para $\delta^{13}\text{C}$ con base en la diferencia entre los valores δ observados y conocidos de los estándares. La incertidumbre analítica total fue de $\pm 0,1\text{‰}$ para $\delta^{15}\text{N}$ y $\pm 0,09\text{‰}$ $\delta^{13}\text{C}$.

Tratamiento estadístico de los datos

Para la presentación de los resultados de los distintos tratamientos y controles se optó por el diagrama de cajas y bigotes (*Boxplot* por sus siglas en inglés). El rectángulo abarca el rango (o intervalo) intercuartílico (RIC) de la distribución, representando el primer cuartil (25%) y el tercer cuartil (75%), conteniendo el 50% de las observaciones centrales. El valor de la mediana se representa como una línea continua dentro de la caja. En esta representación, los límites externos o “bigotes” contienen las observaciones con valores por fuera del primer y tercer cuartil. Los límites de los bigotes no superan 1,5 veces el RIC.

Las diferencias entre los grupos de control y control vehículo (si correspondían) se evaluaron mediante la prueba *t* de *Student*. En todos los casos, se evaluó la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos utilizando las pruebas de Shapiro Wilks y Bartlett, respectivamente. Para la comparación de medias entre los diferentes tratamientos se realizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) con la prueba *post hoc* apropiada (test de Tukey). Para aquellas variables que no cumplieron el requisito de normalidad u homocedasticidad de varianzas, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis seguido del *test* de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn. Las diferencias entre medias se consideraron significativamente diferentes cuando el valor $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando R (R Core Team, 2020).

Dentro de la familia de marcadores comportamentales, las comparaciones entre el uso de la columna de agua entre tratamientos se evaluaron mediante un análisis multivariante de la varianza (MANOVA), donde las variables independientes son los grupos (tratamientos) y las variables dependientes son los predictores (tiempo (s) de permanencia en cada uno de los estratos). La normalidad multivariada se evaluó con la prueba de Mardia. La equivalencia de las matrices de covarianza (conocida como “homocedasticidad multivariada”) se evaluó con la prueba *M* de Box.

Con el fin de obtener una interpretación holística de los efectos tóxicos generados por la IVM, se realizó un análisis discriminante lineal (ADL). En el ADL, las variables independientes (parámetros biológicos) son los predictores y las variables dependientes son los grupos (tratamientos). En este estudio se aplicó el ADL para explicar la contribución de las variables continuas originales (respuestas de biomarcadores) por grupo de biomarcadores

(hematológicos, bioquímicos y comportamentales). Para explicar la importancia relativa de las variables explicativas individuales en las funciones discriminantes, se calculó el índice de potencia de cada variable (Hair et al., 2010).

Además, se realizó un análisis de validación cruzada basado en la distancia mínima de Mahalanobis a la media del grupo para evaluar la correcta asignación de los individuos a cada tratamiento. La distancia de Mahalanobis se calcula a partir de la matriz de covarianza agrupada dentro del grupo, lo que proporciona un clasificador discriminante lineal. La validación cruzada se utilizó para comprobar la capacidad predictiva de la función discriminante. Para establecer el sesgo del análisis de clasificación cruzada, se realizó una prueba kappa de Cohen, que estima la mejora sobre la probabilidad de las tasas de clasificación porcentual corregidas (Titus et al., 1984). Este último análisis permite evaluar si los resultados del análisis de validación cruzada son diferentes a los obtenidos por azar utilizando la escala de la tabla 4.

Tabla 4- Tabla para la interpretación del valor obtenido para la prueba Kappa de Cohen.

Valor de Kappa de Cohen	Categorización de la concordancia
0	No hay concordancia
0,01-0,2	Pobre concordancia
0,21-0,40	Concordancia justa
0,41-0,60	Concordancia moderada
0,61-0,80	Concordancia substancial
0,81-0,99	Concordancia casi perfecta
1	Concordancia perfecta

Todos los análisis multivariantes se realizaron con el software Past 3.26 (Hammer et al., 2001).

Resultados

Estabilidad de la ivermectina en condiciones experimentales

La tasa de recuperación del método de extracción fue del $84,73 \pm 7,40$ %; el límite de cuantificación y el límite de detección fueron de 0,01 mg/L y 0,005 mg/L, respectivamente.

Las concentraciones medidas de IVM en muestras replicadas de agua tomadas a las 0, 24, 48 y 72 h de los acuarios que contenían 0,05 y 0,5 mg/L de IVM se indican en la Tabla 5. Las concentraciones medidas en el tiempo 0 fueron del 88 % y el 72 % de las concentraciones nominales (0,05 y 0,5 mg/L respectivamente). Después de 24 h, las concentraciones medidas aumentaron un 13,9 % y un 2,7 % por encima de las concentraciones nominales. A las 48 h la

concentración medida rondaba el 50% de la concentración original, estableciéndose 48 h como tiempo razonable para la renovación total del medio durante el experimento. No se detectó IVM en muestras del acuario de control.

Tabla 5- Resultados del ensayo de caída de las concentraciones de ivermectina en condiciones experimentales. Concentraciones reales de IVM en agua a las 0 h, 24 h, 48 h y 72 h posterior al agregado de alícuota inicial de solución madre de IVM.

Tiempo (h)	0,05 mg/L			0,5 mg/L		
	Concentración real		%	Concentración real		%
	(mg/L)			(mg/L)		
0	0,044	± 0,004	88,0	0,360	± 0,033	72,1
24	0,057	± 0,012	113,9	0,513	± 0,087	102,7
48	0,025	± 0,009	51,0	0,281	± 0,028	56,2
72	0,014	± 0,006	27,9	0,214	± 0,031	42,9

Los valores indican el promedio ± la desviación estándar de las concentraciones reales registradas en dos muestras tomadas de un mismo acuario experimental. El % indica los valores para las concentraciones medidas expresadas como porcentaje de la concentración nominal.

Toxicidad letal aguda de la ivermectina en agua

No se registró mortalidad en ninguno de los acuarios control y control vehículo. En todos los tratamientos con IVM se observaron signos de aletargamiento en los peces. En las concentraciones más altas de IVM se observó pérdida del equilibrio y nado lateralizado.

La mortalidad registrada en los diferentes tratamientos se presenta en la tabla 6.

Tabla 6- Mortalidad registrada en el ensayo de toxicidad letal aguda de la ivermectina en agua para la estimación del LC₅₀ de 48 h.

		Concentraciones IVM ensayadas (µg/L)					
		Control	Control vehículo	0,5	1	2,5	5
Número de sobrevivientes	Réplica 1	5	5	5	0	0	0
	Réplica 2	5	5	5	5	3	0
	Réplica 3	5	5	5	5	4	0
	Total vivos	15	15	15	10	7	0
Total muertos		0	0	0	5	8	15

La CL₅₀ de 48 horas de postlarvas de *P. lineatus* estimada por el método *PriProbit* fue de 1,7492 µg/L (IC 95%: 1,2959-2,3846) (Figura 45). Los valores de NOEC y LOEC obtenidos experimentalmente fueron de 0,5 y 1,0 µg IVM/L respectivamente.

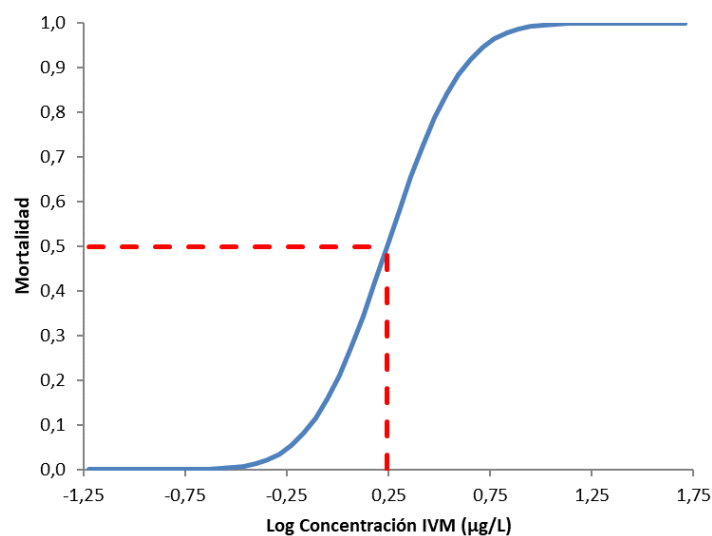


Figura 45- Curva de mortalidad obtenida en el ensayo de toxicidad letal aguda de la ivermectina en agua. Las líneas punteadas indican la intersección donde ocurre el 50% de la mortalidad y su respectiva concentración estimada (escala logarítmica).

Exposición *ex vivo* de branquias de *Prochilodus lineatus*

No se observaron diferencias significativas entre el control y el control vehículo de metanol (0,01% v/v) ($p > 0,05$), por lo que todas los contrastes y análisis fueron realizados con el tratamiento control de vehículo.

En la figura 46 se muestran los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores evaluados en este bioensayo. No se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos (test de Tukey, $p > 0,05$) con IVM para ninguno de los parámetros analizados.

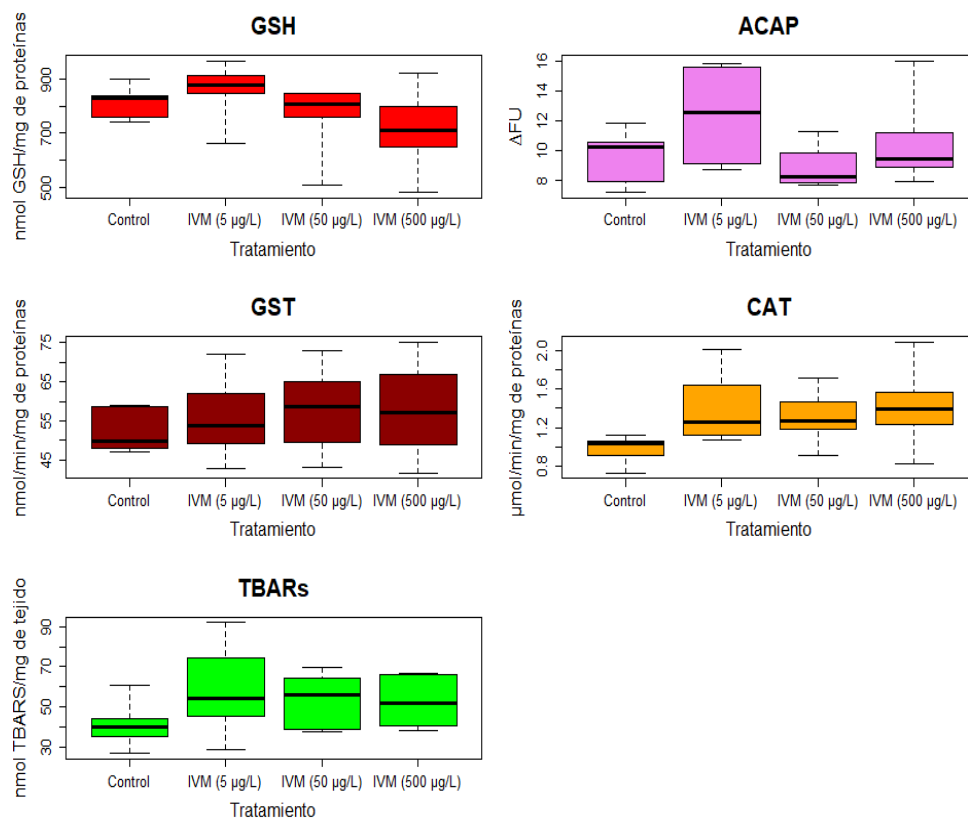


Figura 46- Boxplot de los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo evaluados en branquias de *P. lineatus* sometidas a tres concentraciones de ivermectina diferentes: 5, 50 y 500 µg/L.

El análisis de discriminante lineal (ADL) fue realizado incluyendo todos los biomarcadores evaluados en las branquias (Figura 47). El ordenamiento de los datos utilizando la función discriminante no reveló diferencias entre los tratamientos y el control, mostrando un alto grado de solapamiento entre los grupos.

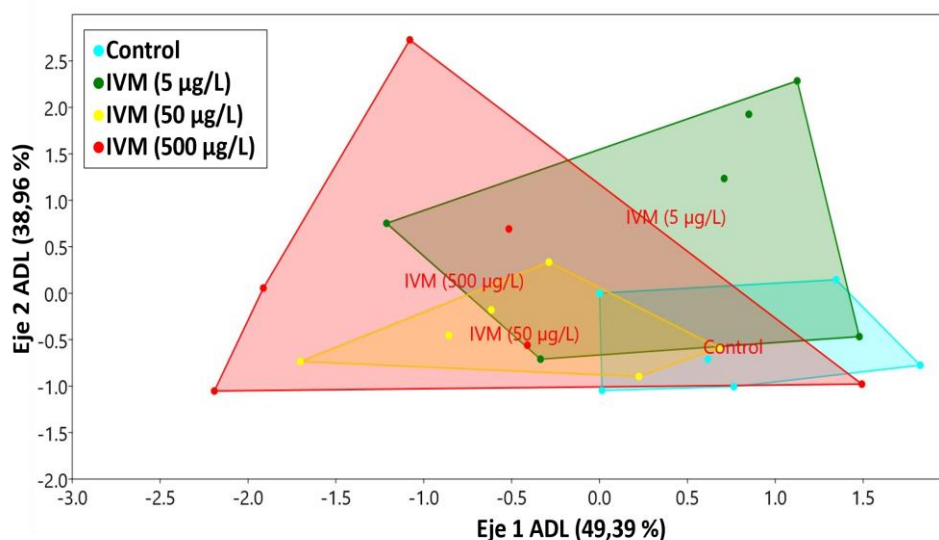


Figura 47- Análisis de discriminante lineal agrupando por tratamientos e incluyendo todos los biomarcadores evaluados. El área celeste representa el Control y los colores verde, amarillo y rojo representan los tratamientos de 5, 50 y 500 µg/L de ivermectina respectivamente.

En análisis de clasificación reportó un 58,33% de asignación correcta de las muestras a su respectivo tratamiento, con un coeficiente kappa de Cohen de 0,44 indicando una diferencia moderada o justa con respecto a lo obtenido por azar.

El análisis de los índices de potencia (Tabla 7) mostró que la actividad de la enzima CAT y la capacidad antioxidante contra radicales peroxilos (ACAP) juegan un rol dominante en el análisis discriminante.

Tabla 7- Resultados del análisis de discriminante con los biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo en branquias de *P. lineatus*.

Parámetro	Pesos de la primera función discriminante	Pesos de la segunda función discriminante	Pesos de la tercera función discriminante	Índice de potencia
GSH	0,0062553	0,00050056	0,0059492	0,00002
GST	-0,042148	-0,0066488	0,0027273	0,00089
TBARs	-0,0087064	0,012853	0,042596	0,00012
ACAP	0,10613	0,29514	-0,30334	0,04057
CAT	-1,8412	1,1018	0,60165	2,15140

Toxicidad subletal subcrónica de la ivermectina en agua: 15 días de exposición

Durante los experimentos, no se registró mortalidad en ninguno de los tratamientos con IVM o controles. No se observaron diferencias significativas entre el control y el control del vehículo para los biomarcadores comportamentales, morfométricos, hematológicos o bioquímicos. Por lo tanto, todas las comparaciones y contrastes estadísticos se realizaron con los datos de control del vehículo. Debido a una serie de dificultades logísticas y de envejecimiento de las muestras a raíz de la pandemia del virus SARS-CoV-2, los hígados de los diferentes tratamientos no fueron evaluados en este experimento, como así tampoco los niveles del antioxidante GSH.

Índices fisiológicos y morfométricos

El factor de condición (FC) mostró valores subóptimos (≤ 1) durante todo el experimento (Tabla 8). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos IVM y el control del vehículo para los tiempos ensayados. El índice hepatosomático (IHS) mostró una tendencia a aumentar con las concentraciones de IVM no significativas (Tabla 8).

Tabla 8- Factor de condición (FC) e índice hepatosomático (IHS) de juveniles de *P. lineatus* registrado al final del experimento de 15 días de exposición a ivermectina en agua.

Índice	Control	IVM (0,5 $\mu\text{g/L}$)	IVM (1,5 $\mu\text{g/L}$)
FC	$0,94 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,03$
IHS	$1,08 \pm 0,22$	$1,26 \pm 0,28$	$1,25 \pm 0,22$

Los valores indican la media $\pm$ error estándar.

Biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo

Los niveles de actividad de la enzima GST en las branquias mostraron una disminución significativa en la concentración más baja de IVM en comparación con el grupo de control (test de Tukey, $p = 0,022$) (Figura 48). Los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes y detoxificantes de CAT y GST (excepto el mencionado), ACAP y los niveles de peroxidación lipídica (TBARS) en encéfalo y branquias no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo de control en ninguno de los tratamientos (Figura 48 y 49).

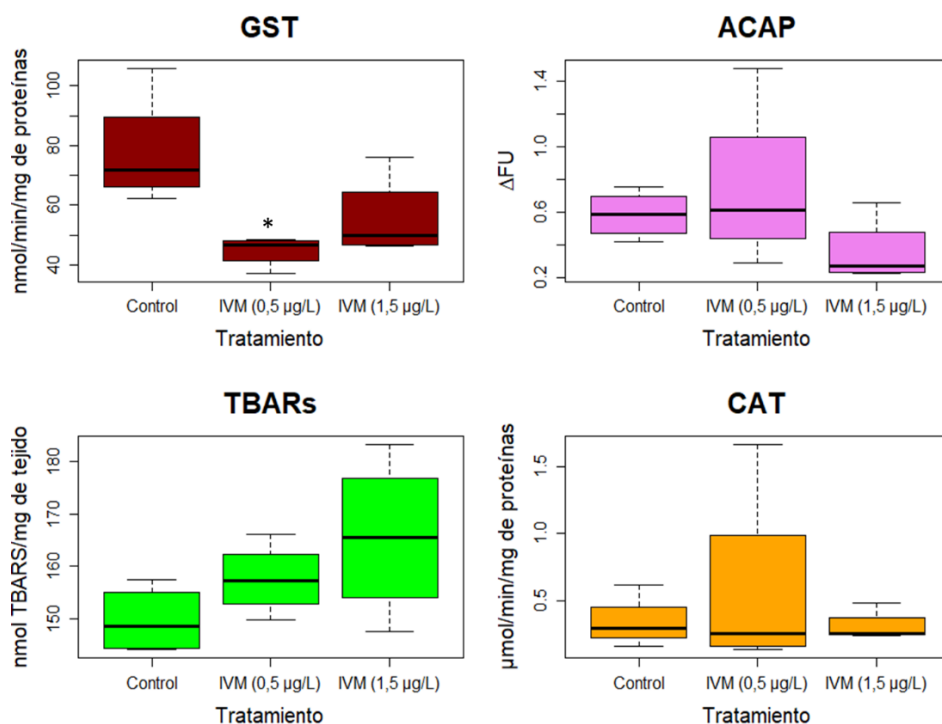


Figura 48- Boxplot de los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo evaluados en branquias tras una exposición de 15 días a dos concentraciones de IVM. *indica diferencias significativas frente al control (test de Tukey, $p < 0,05$).

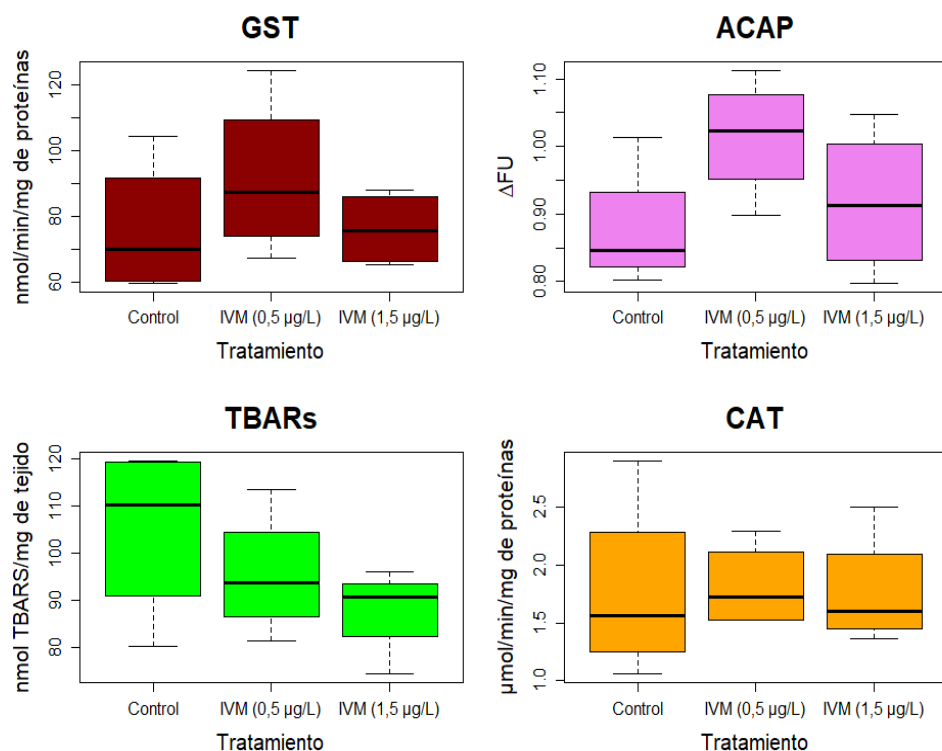


Figura 49- Boxplot de los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo evaluados en encéfalo tras una exposición de 15 días a dos concentraciones de IVM.

Una tendencia no significativa de aumento ($p > 0,05$) en la actividad de AChE se asoció con el aumento de las concentraciones de IVM (Figura 50).

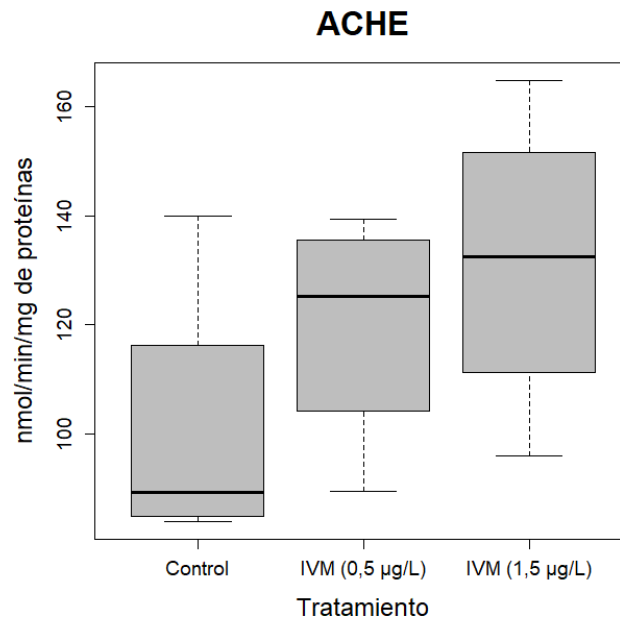


Figura 50- Boxplot de los resultados obtenidos para la actividad de la enzima acetilcolinesterasa cerebral evaluados en encéfalo tras una exposición de 15 días a dos concentraciones de IVM.

Biomarcadores comportamentales: comportamiento natatorio

Se observaron efectos asociados al tratamiento con IVM en el comportamiento de natación (Figura 51). Los peces tratados con la concentración más baja de IVM tuvieron una disminución significativa ($p = 0,046$) en la velocidad durante la respuesta de escape en comparación con el grupo de control. Los peces tratados con la concentración más alta de IVM tuvieron un ligero decaimiento en la proporción de tiempo en actividad, la velocidad de natación de rutina y la distancia total recorrida; sin embargo, todas estas diferencias no fueron significativas ($p \geq 0,05$). El uso de la columna de agua de los peces tratados con IVM no fue significativamente diferente del grupo de control (Figura 52).

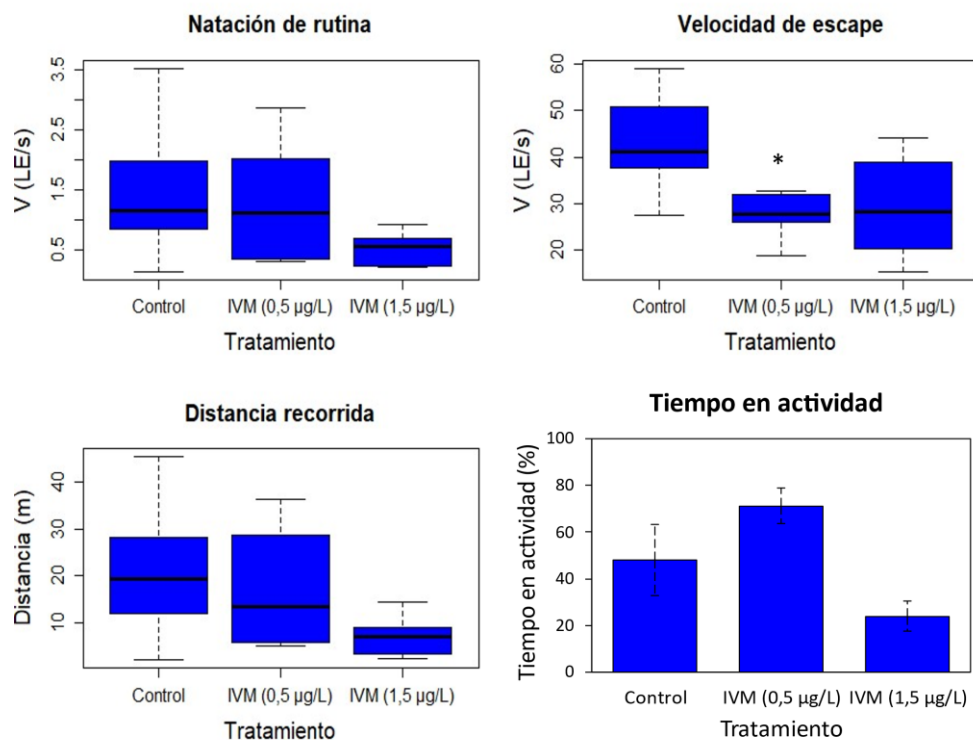


Figura 51- *Boxplot* de los resultados obtenidos para la natación de rutina, velocidad de escape y distancia total recorrida de juveniles tras una exposición de 15 días a dos concentraciones de IVM. El histograma muestra la proporción porcentual del tiempo en actividad natatoria por tratamiento. *indica diferencias significativas frente al control (test de Tukey, $p < 0,05$).

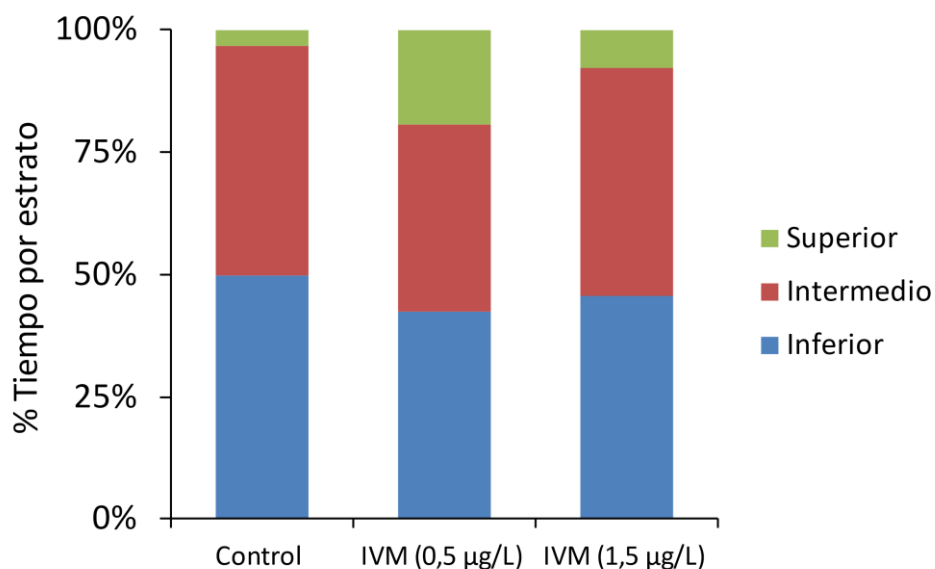


Figura 52- Proporción porcentual del tiempo de permanencia en cada estrato del acuario de los juveniles expuestos a dos concentraciones de IVM.

Biomarcadores hematológicos

Los parámetros hematológicos y los índices asociados no mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de IVM y los grupos control (Tabla 9).

Tabla 9- Parámetros hematológicos de juveniles expuestos 15 días a dos concentraciones de IVM.

Índice	Control	IVM (0,5 µg/L)	IVM (1,5 µg/L)
Glucemia (mg/dL)	38,5 ± 6,9	35,0 ± 3,3	37,7 ± 4,6
Ht%	18,33 ± 2,69	18,2 ± 1,1	15,2 ± 2,1
Hb (g/dL)	5,39 ± 1,58	7,24 ± 1,88	4,29 ± 1,17
RGR (x10 ⁶ / µL)	1,36 ± 0,47	1,53 ± 0,14	0,89 ± 0,38
VCM (fL)	189,8 3± 50,28	119,52 ± 14,43	422,39 ± 182,68
HCM (pg)	4,36 ± 0,611	4,73 ± 1,19	9,42 ± 3,66
CHCM (%)	26,05 ± 5,38	42,09 ± 13,09	23,16 ± 3,47

Los valores indican la media ± error estándar.

Análisis discriminante (estadística multivariada)

Se realizó un ADL por separado para cada conjunto de biomarcadores (hematológicos, comportamentales y bioquímicos/estrés). Usando las funciones discriminantes, el ordenamiento de los datos bioquímicos y de comportamiento mostró diferencias entre el control y los tratamientos, a pesar de la ocurrencia de superposiciones entre las concentraciones de IVM (Figura 53). Los marcadores hematológicos mostraron una alta superposición entre controles y tratamientos.

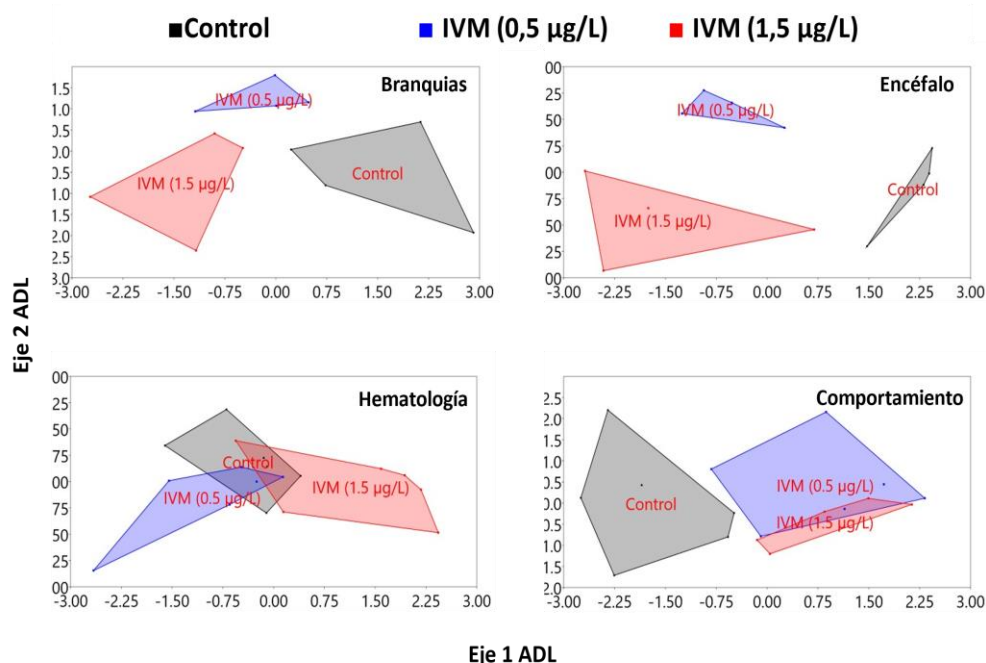


Figura 53- Ordenamiento de los datos del análisis discriminante lineal (ADL) que representan el efecto general para cada conjunto de biomarcadores de estrés bioquímico/oxidativo (encéfalo y branquias), hematología y comportamiento. Área gris grupo control; área azul: baja concentración de IVM (0,5 µg/L) y área roja: alta concentración de IVM (1,5 µg/L).

Se observaron valores elevados en el análisis de clasificación cruzada correcta para los parámetros bioquímicos/estrés en encéfalo (91,67 %) seguido de branquias (83,33 %) con un valor Kappa alto ($Kappa > 0,81$, clasificación correcta, casi perfecta) (Tabla 10). Los datos de comportamiento mostraron un porcentaje global de clasificación cruzada correcta del 77,78% frente al 33,33% de concordancia obtenida por el azar ($Kappa = 0,66$, sustancialmente correcta). El conjunto de parámetros hematológicos mostró el porcentaje más bajo de clasificación cruzada correcta (66,67 %) con un valor de Kappa bajo ($Kappa = 0,5$) que indica un nivel moderado de concordancia no aleatoria.

El índice de potencia mostró que ACAP y CAT, en encéfalo y branquias, desempeñaron un papel dominante en el análisis discriminante con los biomarcadores bioquímicos/de estrés.

En cuanto a los marcadores comportamentales, la natación de rutina (NR) desempeñó el papel principal en el análisis discriminante mostrando el índice de potencia más alto. En el caso de los biomarcadores hematológicos, HCM y Hb fueron los que jugaron un mayor papel en el análisis discriminante entre tratamientos (Tabla 10).

Tabla 10- Resultados del análisis discriminante del conjunto de datos de biomarcadores bioquímicos/estrés (encéfalo y branquias), hematológicos y de comportamiento.

Grupo de biomarcadores	Parámetro	Pesos de la primera función discriminante	Pesos de la segunda función discriminante	Índice de potencia	% de clasificación correcta
Hematológicos	Glucosa	0,029112	-0,015714	0,0007	66,67
	Ht%	-0,23193	-0,044226	0,0449	
	Hb	0,12981	1,4101	0,3553	
	RGR	1,91E-12	-3,07E-12	0,0000	
	VCM	-0,014407	0,013862	0,0002	
	HCM	1,0499	-0,95337	1,0691	
	CHCM	-0,16649	-0,14779	0,0267	
Bioquímicos y de estrés	Encéfalo	GST	0,079743	0,016858	91,67
		TBARs	0,071555	0,082535	
		ACAP	14,115	-3,6565	
		CAT	-1,4293	-0,61023	
	Branquias	GST	0,038743	-0,057857	83,33
		TBARs	-0,064529	-0,049355	
		ACAP	4,3839	3,4436	
		CAT	-3,0126	-1,7141	
		NR	7,2275	1,5586	
	Comportamentales	DTR	-0,0065027	4,30E-05	77,78
		VMN	-0,10156	-0,043887	
		TTA	0,012019	-0,0070739	

Toxicidad subletal subcrónica de la ivermectina en agua: 30 días de exposición

Durante los experimentos, no se registró mortalidad en ninguno de los tratamientos con IVM o controles. No se observaron diferencias significativas entre el control y el control del vehículo para los biomarcadores comportamentales, morfométricos, hematológicos, bioquímicos o isotópicos. Por lo tanto, todas las comparaciones y contrastes estadísticos se realizaron con los datos de control del vehículo.

Índices fisiológicos y morfométricos

El factor de condición (FC) mostró valores subóptimos (≤ 1) durante todo el experimento (Tabla 11). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos IVM y el control del vehículo. El índice hepatosomático (IHS) no mostró diferencias entre los tratamientos (Tabla 11).

Tabla 11- Factor de condición (FC) e índice hepatosomático (IHS) de juveniles de *P. lineatus* registrado al final del experimento de 30 días de exposición a ivermectina en agua.

Índice	Control	IVM (0,5 µg/L)	IVM (1,5 µg/L)
FC	0,68 ± 0,01	0,73 ± 0,02	0,70 ± 0,01
IHS	0,63 ± 0,08	0,63 ± 0,08	0,62 ± 0,06

Los valores indican la media ± error estándar.

Biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo

Los niveles de actividad de la enzima CAT en las branquias mostraron un aumento significativo en la concentración más baja de IVM en comparación con el grupo de control (test de Dunn, $p = 0,002$) (Figura 54). Los niveles de actividad del resto de las enzimas detoxificantes GST y antioxidantes CAT (excepto el mencionado), ACAP, los niveles de peroxidación lipídica (TBARS) y los niveles de antioxidantes no enzimáticos (GSH) en branquias, encéfalo e hígado no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo de control en ninguno de los tratamientos (Figura 54, 55 y 56).

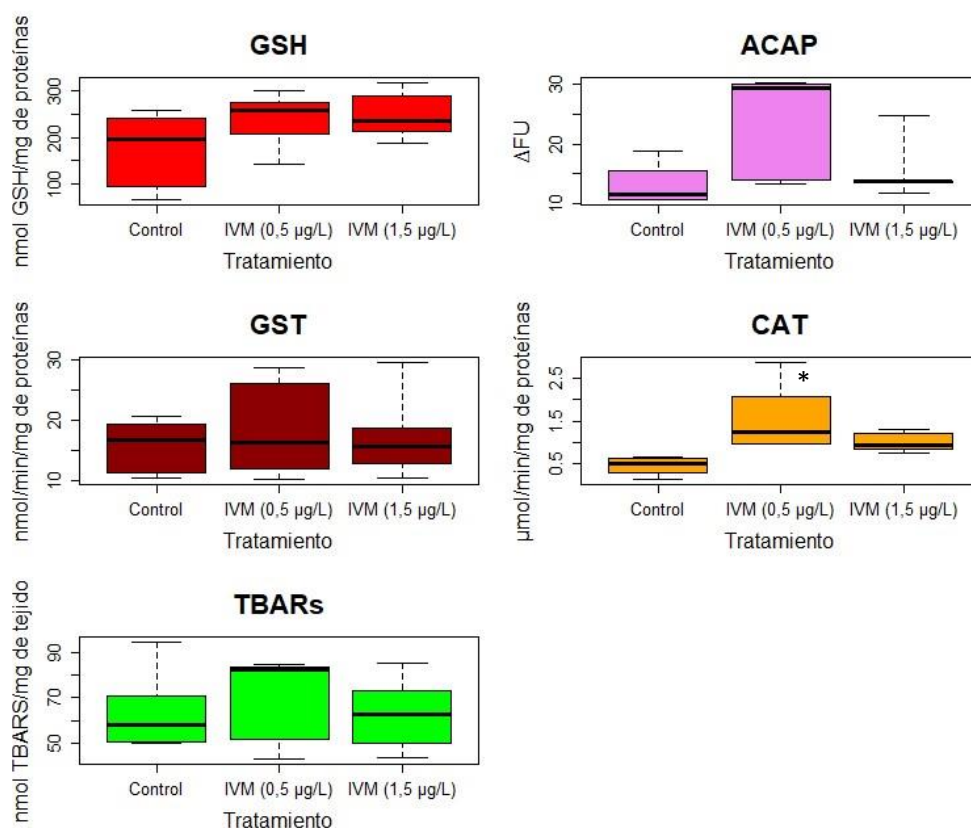


Figura 54- Boxplot de los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo evaluados en branquias tras una exposición de 30 días a dos concentraciones de IVM. *indica diferencias significativas frente al control (test de Dunn, $p < 0,05$).

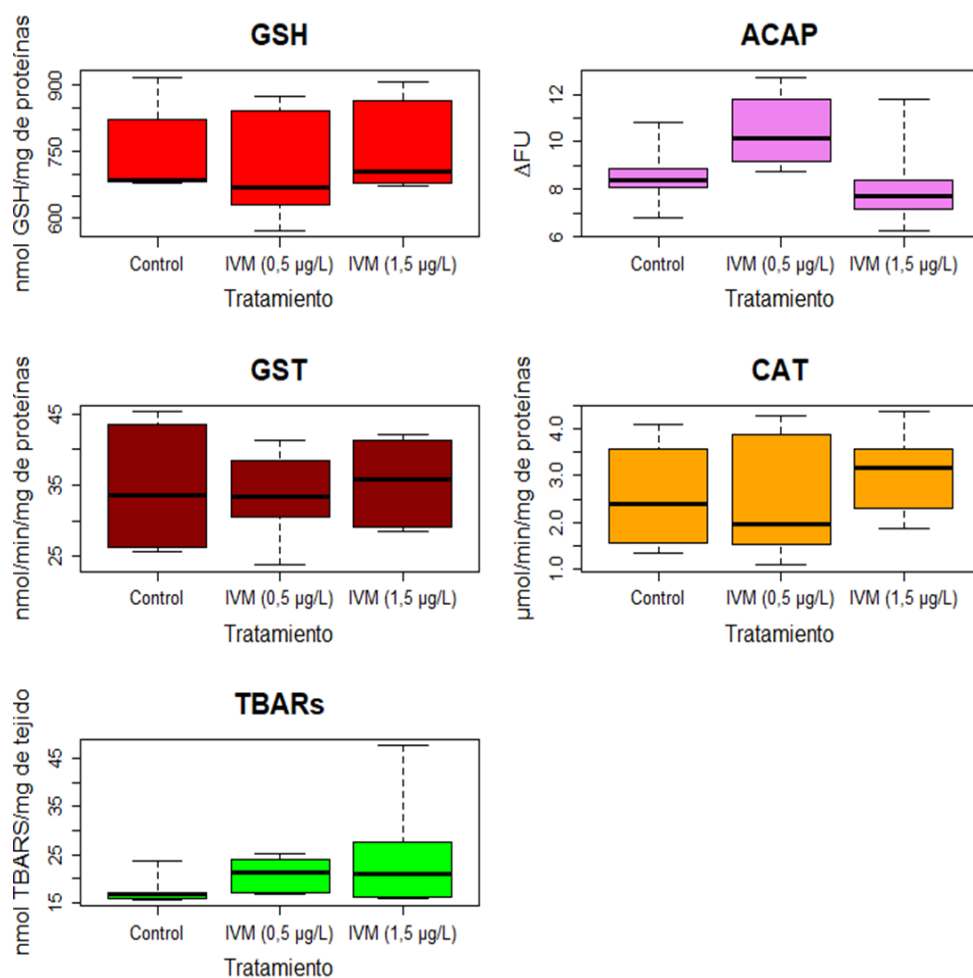


Figura 55- Boxplot de los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo evaluados en encéfalo tras una exposición de 30 días a dos concentraciones de IVM.

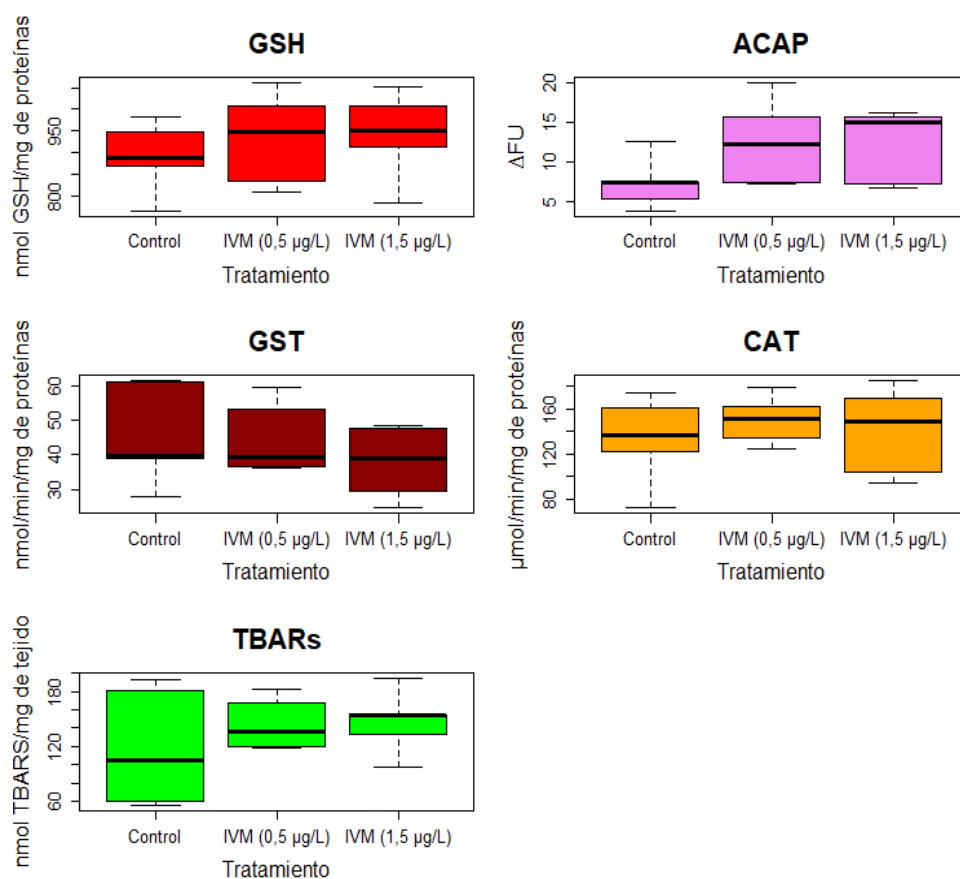


Figura 56- Boxplot de los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo evaluados en hígado tras una exposición de 30 días a dos concentraciones de IVM.

No se observaron diferencias significativas ni tendencias en la actividad de AChE entre los distintos tratamientos y el control (Figura 57).

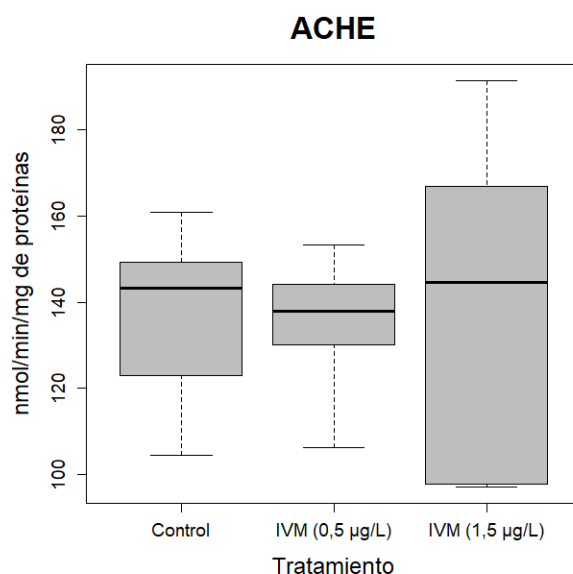


Figura 57- Boxplot de los resultados obtenidos para la actividad de la enzima acetil colinesterasa cerebral evaluados en encéfalo tras una exposición de 30 días a dos concentraciones de IVM.

Biomarcadores comportamentales: comportamiento natatorio

No se observaron efectos asociados al tratamiento con IVM en el comportamiento de natación para ninguno de los marcadores evaluados (Figura 58).

El uso de la columna de agua de los peces tratados con IVM no fue significativamente diferente del grupo de control (Figura 59).

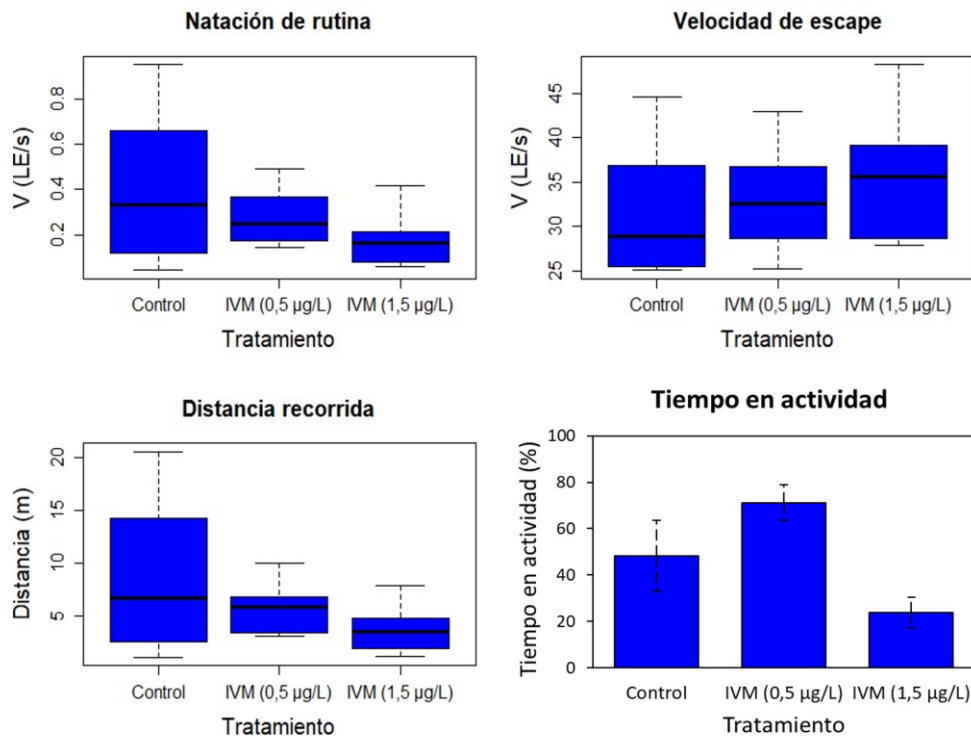


Figura 58- Boxplot de los resultados obtenidos para la natación de rutina, velocidad de escape y distancia total recorrida de juveniles tras una exposición de 30 días a dos concentraciones de IVM. El histograma muestra la proporción porcentual del tiempo en actividad natatoria por tratamiento.

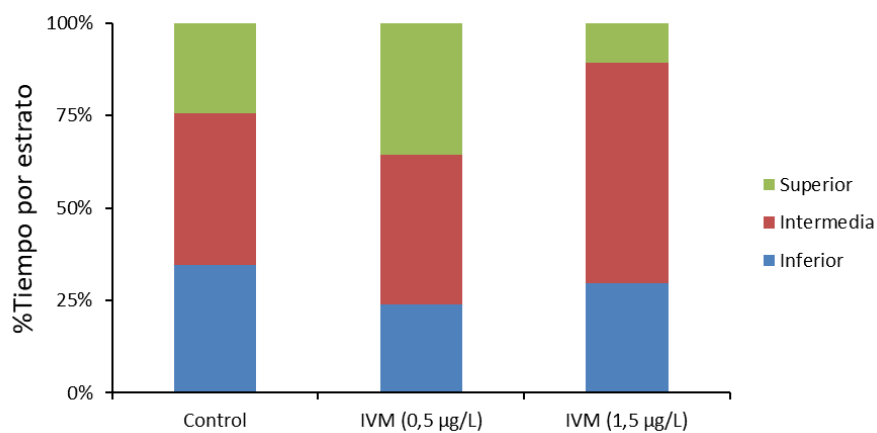


Figura 59- Proporción porcentual del tiempo de permanencia en cada estrato del acuario de los juveniles expuestos a dos concentraciones de IVM.

Biomarcadores histológicos

Los animales del grupo control presentaron branquias y epitelio branquial de estructura normal (Figura 60). El epitelio interlamelar no superó los tres estratos de altura. Se observaron células clorhídricas, células mucosas y elementos sanguíneos.

Las patologías más evidentes fueron observadas en aquellos peces expuestos a la concentración más alta de IVM (1,5 $\mu\text{g/l}$). Se observaron aneurismas, congestión sanguínea en filamentos primarios (hemorragias), desorganización del epitelio interlamelar y de las laminillas secundarias (telangiectasias). Todas consideradas anomalías de origen circulatorio (Figura 61).

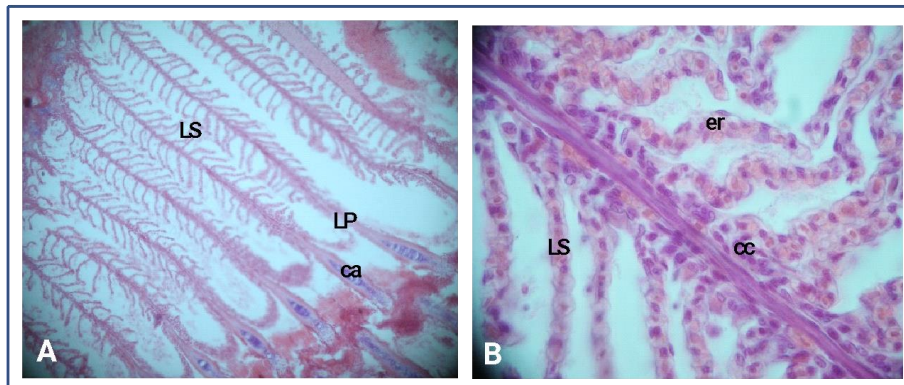


Figura 60- Cortes transversales de branquia de *P. lineatus*. Se observan branquias representativas de animales del grupo control con típica organización branquial. Coloración H-E. A: 100x. B: 600x. ca: cartílago; cc, célula clorhídrica; er, eritrocito; LP, lamela primaria; LS, lamela secundaria.

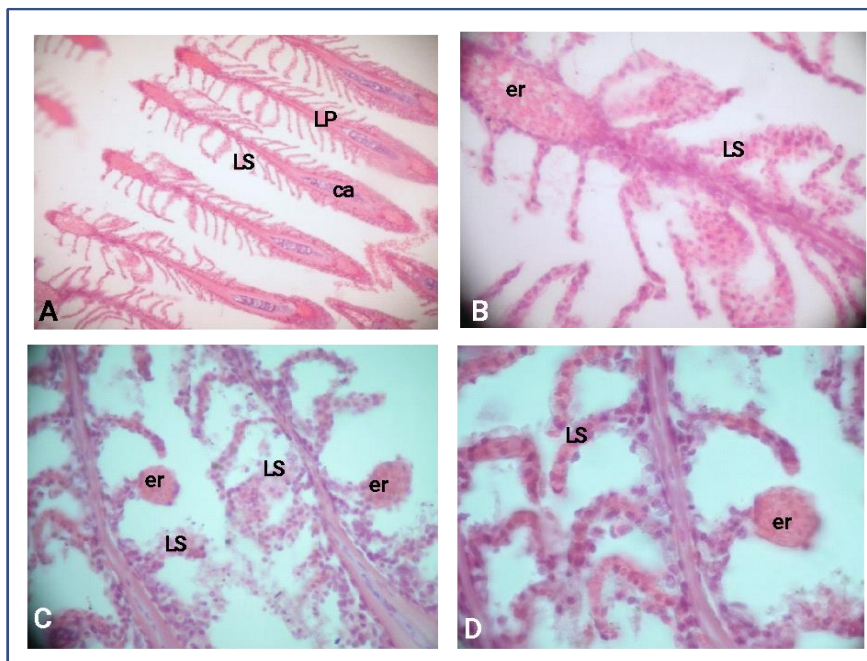


Figura 61- Cortes transversales de branquia de *P. lineatus* expuestos a la concentración más alta de IVM (1,5 $\mu\text{g/l}$). Se evidencian aneurismas, congestión sanguínea en filamentos primarios y telangiectasias en las lamelas secundarias. Coloración H-E. A: 100x; B y C: 400x; D: 600x. ca: cartílago; cc, célula clorhídrica; er, eritrocito; LP, lamela primaria; LS, lamela secundaria.

Biomarcadores hematológicos

Los parámetros hematológicos y los índices asociados no mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de IVM y los grupos control (Tabla 12).

Tabla 12- Parámetros hematológicos de juveniles de *P. lineatus* expuestos 30 días a dos concentraciones de IVM.

Índice	Control	IVM (0,5 µg/L)	IVM (1,5 µg/L)
Glucemia (mg/dL)	39,8 ± 3,9	34,7 ± 4,0	37,8 ± 4,6
Ht%	24,17 ± 3,27	24,33 ± 1,36	25,00 ± 3,42
Hb (g/dL)	9,94 ± 1,02	10,35 ± 1,39	11,06 ± 0,39
RGR (x10 ⁶ / µL)	2,28 ± 0,39	2,50 ± 0,10	2,46 ± 0,24
VCM (fL)	113,97 ± 27,96	101,71 ± 7,80	116,72 ± 10,26
HCM (pg)	4,68 ± 0,54	4,13 ± 0,47	4,63 ± 0,38
CHCM (%)	50,86 ± 13,98	41,24 ± 5,58	40,30 ± 3,00

Biomarcadores isotópicos: señales isotópicas de carbono y nitrógeno

Las firmas $\delta^{15}\text{N}$ y de $\delta^{13}\text{C}$ no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos con IVM y el control (Figura 62). Tampoco se observaron diferencias entre el cociente C/N (Figura 46).

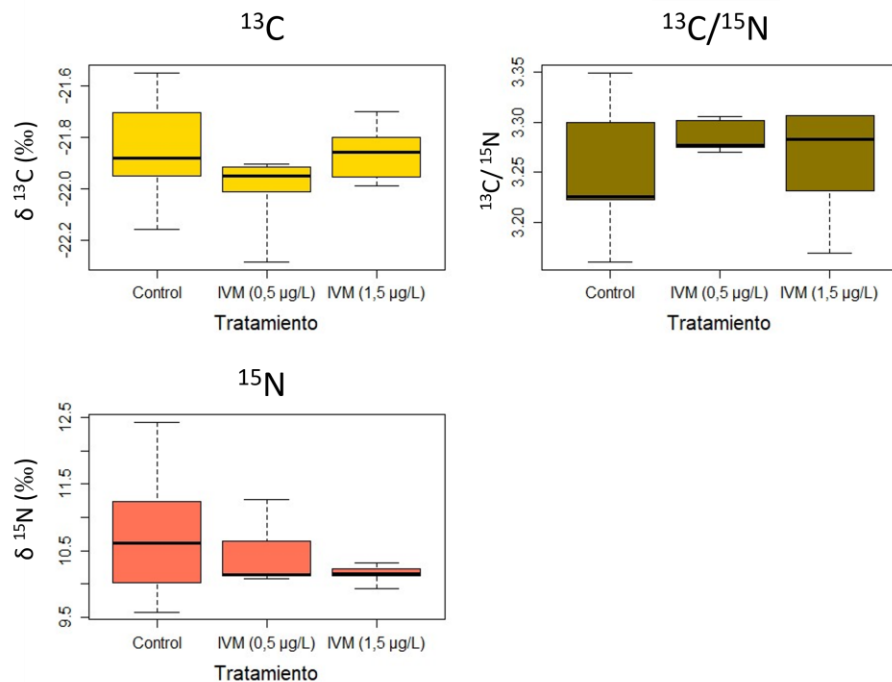


Figura 62- Boxplot de $\delta^{15}\text{N}$, de $\delta^{13}\text{C}$ y relación C/N de tejido muscular de juveniles de sábalo sometidos a dos concentraciones de IVM y un control.

Análisis discriminante (estadística multivariada)

Se realizó un ADL por separado para cada conjunto de biomarcadores (hematológicos, comportamentales y bioquímicos/estrés). Usando las funciones discriminantes, el ordenamiento de los datos bioquímicos de branquias y los datos de comportamiento y mostraron diferencias entre el control y los tratamientos, a pesar de la ocurrencia de superposiciones (Figura 63). Los marcadores hematológicos y bioquímicos de hígado y encéfalo mostraron una alta superposición entre controles y tratamientos.

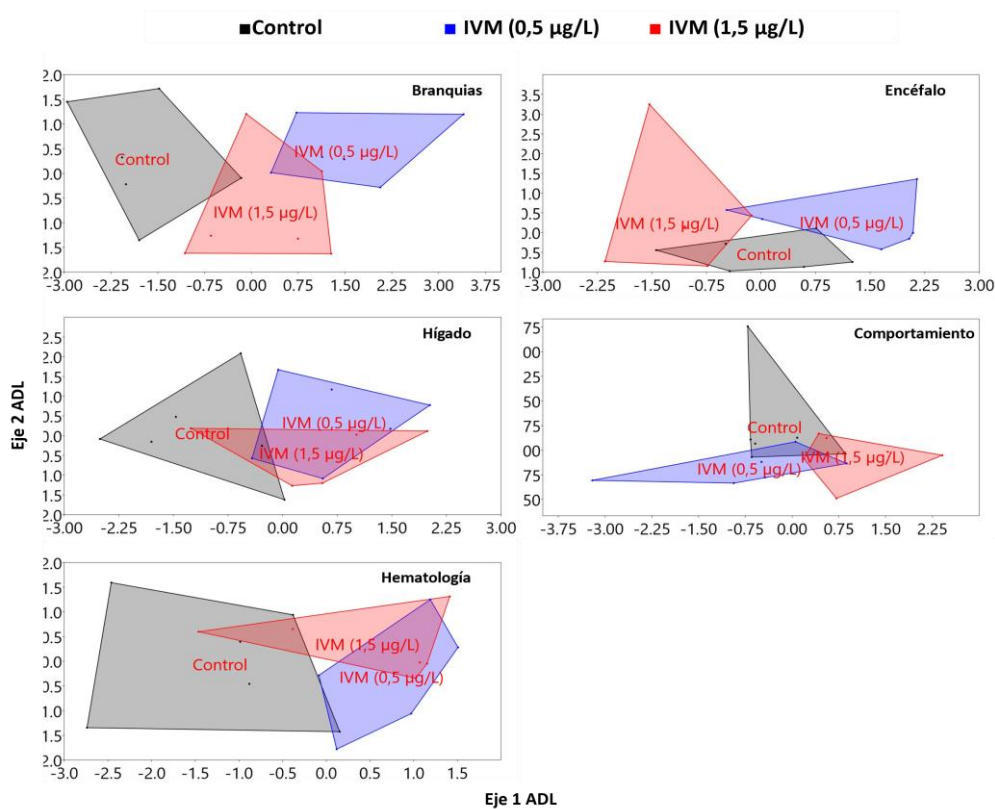


Figura 63- Ordenamiento de los datos del análisis discriminante lineal (ADL) que representan el efecto general para cada conjunto de biomarcadores de estrés bioquímico/oxidativo (branquias, encéfalo e hígado), hematología y comportamiento. Área gris: grupo control; área azul: baja concentración de IVM (0,5 µg/L) y área roja: alta concentración de IVM (1,5 µg/L).

Se observaron los mayores valores en el análisis de clasificación cruzada correcta para los parámetros bioquímicos/estrés en branquias (77,78 %) seguido de comportamiento (72,22 %) con un valor Kappa de 0,67 (concordancia substancial) y 0,58 (concordancia moderada) respectivamente (Tabla 13). Los datos bioquímicos de encéfalo e hígado y los hematológicos mostraron un porcentaje global de clasificación cruzada correcta del 61,11% frente al 33,33% de concordancia obtenida por el azar (Kappa= 0,42, concordancia moderada). El índice de potencia mostró que, en las branquias, la actividad de CAT desempeñó un papel dominante en el análisis discriminante con los biomarcadores bioquímicos/de estrés. En el hígado y el encéfalo, ACAP

fue uno de los parámetros que más contribuyó en el análisis discriminante. A su vez, en el encéfalo, la actividad de CAT tuvo un rol predominante en el ordenamiento de los datos bioquímicos. En cuanto a los marcadores comportamentales, la natación de rutina (NR) desempeñó el papel principal en el análisis discriminante mostrando el índice de potencia más alto. En el caso de los biomarcadores hematológicos, HCM y Hb fueron los que jugaron un mayor papel en el análisis discriminante entre tratamientos (Tabla 13).

Tabla 13- Resultados del análisis discriminante del conjunto de datos de biomarcadores bioquímicos/estrés (branquias, encéfalo e hígado), hematológicos y de comportamiento.

Grupo de biomarcadores	Parámetro	Pesos de la primera función discriminante	Pesos de la segunda función discriminante	Índice de potencia	% de clasificación correcta	
Hematológicos	Glucosa	-0,063672	0,0075351	0,0037	61,11	
	Ht%	-0,13062	-0,08667	0,0162		
	Hb	1,7621	0,096186	2,8229		
	RGR	-5,32E-12	2,30E-12	0,0000		
	VCM	0,023832	0,033663	0,0006		
	HCM	-3,7426	0,72207	12,7782		
	CHCM	-0,06939	-0,0019366	0,0044		
Bioquímicos y de estrés	Encéfalo	GSH	-0,0035317	-0,0060447	0,0000	61,11
		GST	-0,010042	-0,13429	0,0022	
		TBARs	-0,11399	0,11472	0,0130	
		ACAP	0,66353	0,11873	0,3901	
		CAT	-0,59252	0,50567	0,3399	
	Branquias	GSH	0,01676	-0,018919	0,0003	77,78
		GST	0,11417	0,026677	0,0113	
		TBARs	-0,067246	0,043349	0,0041	
		ACAP	0,16859	0,10487	0,0260	
		CAT	1,1753	0,16636	1,1899	
	Hígado	GSH	0,0026061	-0,0026517	0,0000	61,11
		GST	-0,0097962	0,086362	0,0012	
		TBARs	0,0013316	-0,018939	0,0001	
		ACAP	0,24573	0,18227	0,0565	
		CAT	0,030249	0,0060853	0,0008	
Comportamentales	NR	-2,473	29,88	328,2673	72,22	
	DTR	0,61617	-7,38E-01	0,4394		
	VMN	0,19185	-0,062524	0,0249		
	TTA	-0,041788	-0,035374	0,0016		

Toxicidad subletal subcrónica en agua y sedimentos fortificados

No se registró mortandad durante el período de mantenimiento y aclimatación. Solo un ejemplar del tratamiento de IVM alta (20 µg/kg) murió durante la última semana del experimento.

Parámetros de calidad del agua

Todos los parámetros fisicoquímicos del agua fueron similares a los del período de aclimatación y se mantuvieron constantes durante todo el experimento (Tabla 14). No se observaron diferencias entre los tratamientos control (C) y IVM (bajo y alto) y entre acuarios con y sin peces, excepto para OD (Tabla 14).

Tabla 14- Parámetros del agua medidos en acuarios con y sin peces en condiciones de control o expuestos a concentraciones de IVM.

	Acuario con peces			Acuario sin peces		
	Control	IVM baja (2 µg/Kg)	IVM alta (20 µg/Kg)	Control	IVM baja (2 µg/Kg)	IVM alta (20 µg/Kg)
Temperatura (°C)	24,4 ± 1,7	24,0 ± 0,6	23,8 ± 0,4	23,2 ± 0,1	23,2 ± 0,1	23,1 ± 0,1
OD (mg/L)	8,0 ± 0,5	6,5 ± 1,4	7,5 ± 0,5	0,6 ± 0,5	0,6 ± 0,5	0,6 ± 0,5
pH	9,2 ± 0,1	9,1 ± 0,1	9,2 ± 0,1	8,9 ± 0,2	8,9 ± 0,1	8,9 ± 0,3
Conductividad (µS/cm)	762 ± 48	832 ± 27	804 ± 25	914 ± 107	891 ± 97	937 ± 126

Análisis químico

Las concentraciones nominales y medidas de IVM en agua, sedimentos y SPM en cada acuario se presentan en las tablas 15 y 16.

En acuarios con y sin peces, las concentraciones de IVM en sedimentos medidas después de 24 h de exposición fueron del 25 % de la concentración nominal en el tratamiento de IVM baja y alrededor del 75-90 % en el tratamiento de IVM alta. Luego de 14 días de exposición, los niveles de IVM en ambos tratamientos no cambiaron significativamente ($p > 0.05$) (tabla 15 y 16).

Las concentraciones detectadas en MPS de acuarios con IVM baja mostraron niveles de IVM por debajo del 1 % de la concentración nominal analizada durante 24 h y 14 días. En el tratamiento de IVM alta, los niveles de IVM en MPS fueron alrededor del 0,5% de la concentración nominal a las 24 h con y sin peces. A los 14 días, la concentración de IVM en MPS disminuyó al 0,2 % y al 0,3 % de la concentración nominal en acuarios con y sin peces, respectivamente (tablas 15 y 16).

No se detectó IVM en las muestras de agua filtrada (fracción soluble) en ninguno de los tratamientos al inicio o al final del ensayo con o sin peces.

Tabla 15- Concentraciones de ivermectina en agua, sedimentos y material particulado en suspensión (MPS) en acuarios sin peces.

	24 h			14 días		
	Sedimentos	MPS	Agua	Sedimentos	MPS	Agua
	(µg/kg) peso seco	(µg/kg) peso seco	(µg/L)	(µg/kg) peso seco	(µg/kg) peso seco	(µg/L)
Control	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
IVM baja*	0,52	0,017	<LD	0,54	0,017	<LD
IVM alta**	16,35	0,122	<LD	14,92	0,059	<LD

<LD: por debajo del límite de detección (0,2 µg/kg). *2 µg/kg y **20 µg/kg son concentraciones nominales respectivamente

Tabla 16- Concentraciones de ivermectina en agua, sedimentos y material particulado en suspensión (MPS) en acuarios con peces.

	24 h			14 días		
	Sedimentos	MPS	Agua	Sedimentos	MPS	Agua
	(µg/kg) peso seco	(µg/kg) peso seco	(µg/L)	(µg/kg) peso seco	(µg/kg) peso seco	(µg/L)
Control	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
IVM baja*	0,52	0,028	<LD	0,54	<LD	<LD
IVM alta**	15,99	0,103	<LD	18,05	0,033	<LD

<LD: por debajo del límite de detección (0,2 µg/kg). *2 µg/kg y **20 µg/kg son concentraciones nominales respectivamente

Índices fisiológicos y morfométricos

Después de 14 días de exposición, el factor de condición (FC) mostró valores subóptimos (≤ 1) en todos los tratamientos. No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos fortificados con IVM y el control. El índice hepatosomático (HSI) mostró una tendencia no significativa a disminuir con las concentraciones de IVM (Tabla 17).

Tabla 17- Factor de condición (FC) e índice hepatosomático (IHS) de juveniles de *P. lineatus* registrado al final del experimento de 14 días de exposición a ivermectina en sedimentos.

	Control	IVM baja (2 µg/Kg)	IVM alta (20 µg/Kg)
FC	0,65 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,61 ± 0,05
HSI	0,56 ± 0,04	0,48 ± 0,05	0,43 ± 0,04

Los valores indican la media ± error estándar.

Biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo

La defensa antioxidante no enzimática (contenido de GSH) mostró una disminución significativa en el tejido branquial (Figura 64) en el tratamiento con IVM baja (test de Tukey, $p < 0,05$), y también en el tejido hepático en ambos tratamientos con IVM (test de Dunn, $p < 0,05$) (Figura 66). Se observó un aumento significativo en la actividad CAT hepática (test de Tukey,

$p < 0,05$) en el tratamiento con baja IVM (Figura 66). Los valores de ACAP en tejido branquial mostraron una disminución significativa para ambas concentraciones ensayadas de IVM (test de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 64).

El tratamiento con la concentración más baja de IVM mostró un aumento significativo (test de Tukey, $p < 0,05$) en los parámetros de daño de lípidos (TBARs) en el encéfalo en comparación con el control (Figura 65).

Los niveles de ACAP en el hígado mostraron una disminución significativa en la concentración más baja de IVM (test de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 66).

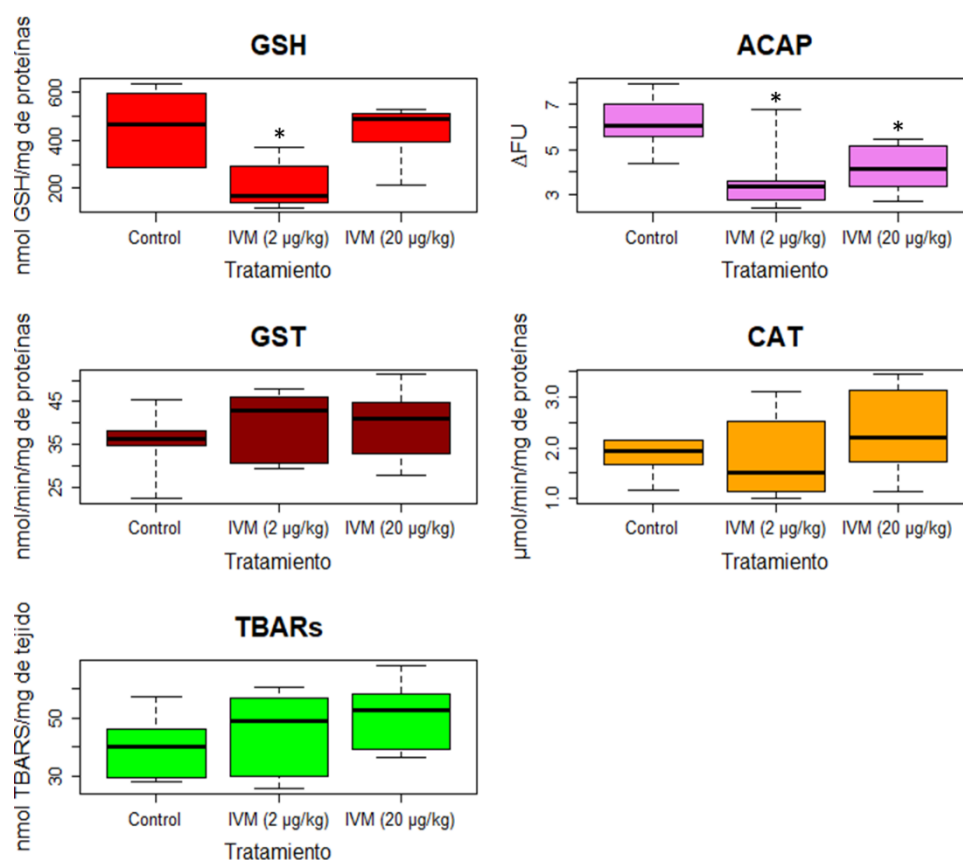


Figura 64- Boxplot de los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo evaluados en branquias tras una exposición de 14 días a dos concentraciones de IVM en sedimentos. *indica diferencias significativas frente al control (test de Tukey, $p < 0,05$).

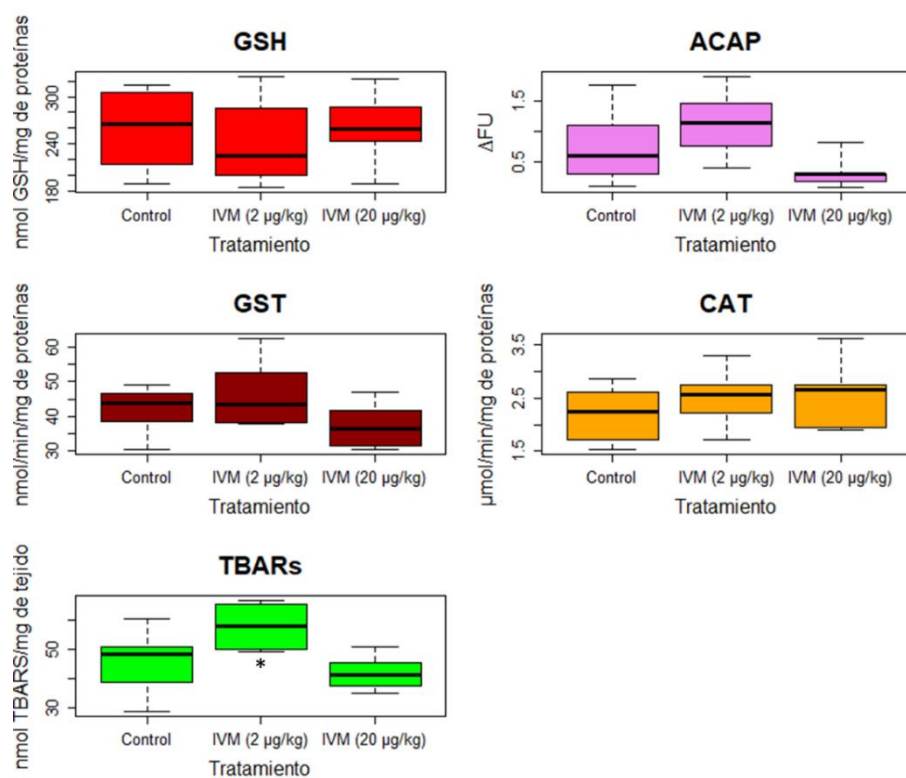


Figura 65- Boxplot de los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo evaluados en encéfalo tras una exposición de 14 días a dos concentraciones de IVM en sedimentos. *indica diferencias significativas frente al control (test de Tukey, $p < 0,05$).

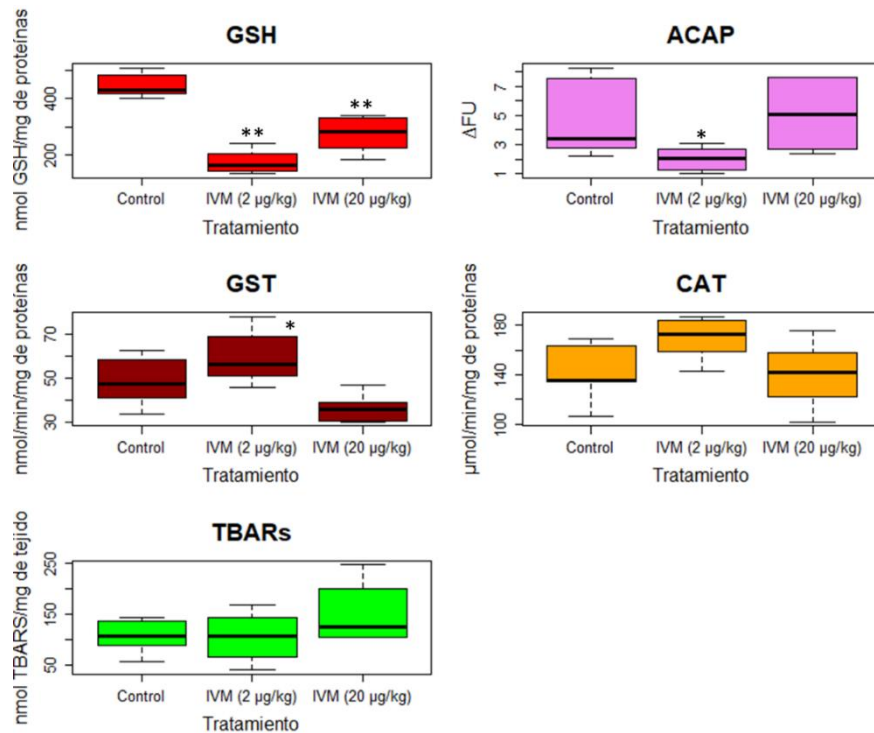


Figura 66- Boxplot de los resultados obtenidos para los distintos biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo evaluados en hígado tras una exposición de 14 días a dos concentraciones de IVM en sedimentos. *indica diferencias significativas frente al control (test de Tukey, $p < 0,05$). ** indica diferencias significativas frente al control (test de Dunn, $p < 0,05$).

La actividad de la AChE muscular mostró una disminución significativa (test de Tukey, $p < 0,05$) en ambos tratamientos con IVM en comparación con el grupo control (-57,7 % y -55,3 %; IVM baja y alta respectivamente) (Figura 67). En el encéfalo no se observaron cambios en la actividad de la AChE (Figura 67).

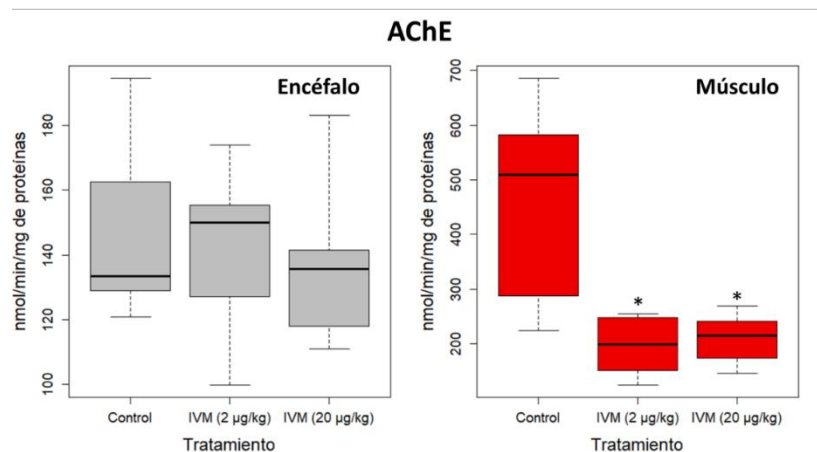


Figura 67- Boxplot de los resultados obtenidos para la actividad de la enzima acetil colinesterasa evaluados en encéfalo y músculo tras una exposición de 14 días a dos concentraciones de IVM en sedimentos. * indica diferencias significativas frente al control (test de Tukey, $p < 0,05$).

Biomarcadores isotópicos: señales isotópicas de carbono y nitrógeno

Las firmas $\delta^{15}\text{N}$ y de $\delta^{13}\text{C}$ no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos con IVM y el control (Figura 68). Tampoco se observaron diferencias entre el cociente C/N (Figura 52).

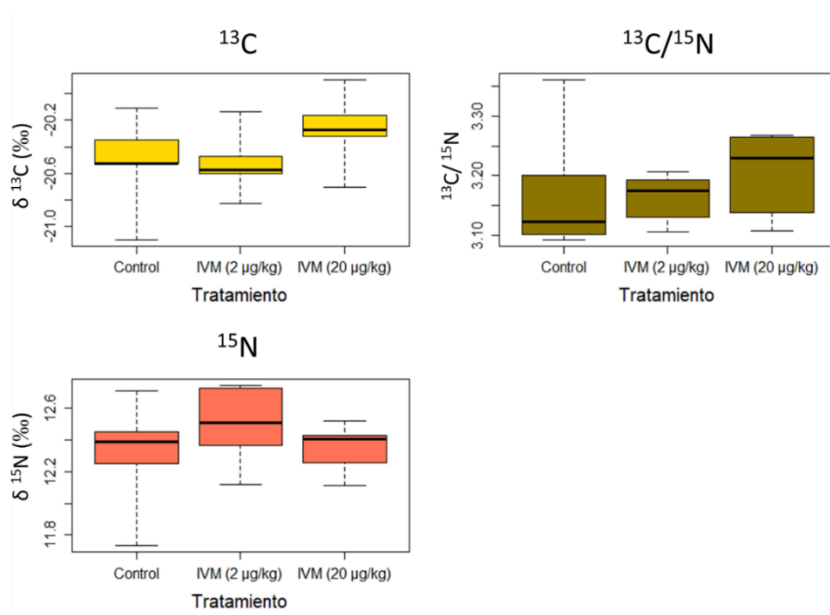


Figura 68- Boxplot de $\delta^{15}\text{N}$, de $\delta^{13}\text{C}$ y relación C/N de tejido muscular de juveniles de sábalo sometidos a dos concentraciones de IVM en sedimentos y un control.

Análisis discriminante (estadística multivariada)

Se realizó un ADL para cada órgano (branquias, encéfalo e hígado) por separado para cada conjunto de biomarcadores bioquímicos y de estrés oxidativo. Usando las funciones discriminantes, el ordenamiento de los datos bioquímicos de hígado y branquias mostraron diferencias entre el control y los tratamientos, a pesar de la ocurrencia de superposiciones en el caso de las branquias (Figura 69). Los marcadores de encéfalo mostraron una alta superposición entre controles y tratamientos.

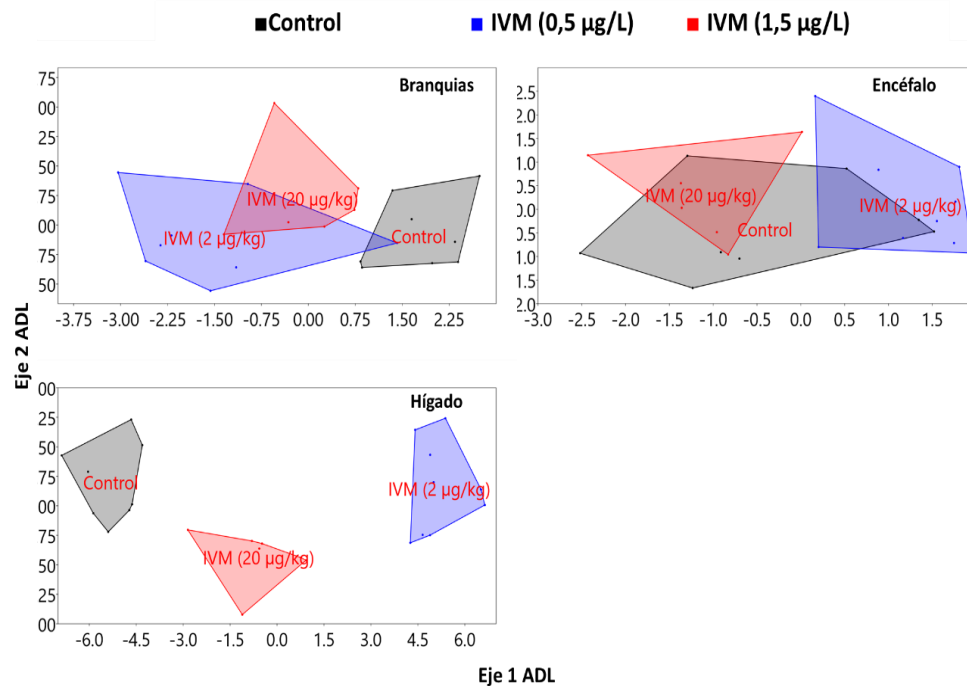


Figura 69- Ordenamiento de los datos del análisis discriminante lineal (ADL) que representan el efecto general para cada conjunto de biomarcadores de estrés bioquímico/oxidativo de branquias, encéfalo e hígado. Área gris: grupo control; área azul: baja concentración de IVM (2 µg/kg) y área roja: alta concentración de IVM (20 µg/kg).

Se observaron los mayores valores en el análisis de clasificación cruzada correcta para los parámetros bioquímicos/estrés de hígado (100 %), con un valor de Kappa de 1 (concordancia perfecta). El análisis de clasificación en branquias también arrojó un alto porcentaje (87,5 %) con un valor Kappa de 0,81 (concordancia casi perfecta) (Tabla 18). Los datos bioquímicos de encéfalo un porcentaje global de clasificación cruzada correcta del 65,5% frente al 33,7% de concordancia obtenida por el azar (Kappa= 0,43, concordancia moderada). El índice de potencia mostró que, en los tres órganos, ACAP desempeñó un papel dominante en el análisis discriminante con los biomarcadores bioquímicos/de estrés. Además de ACAP, en el encéfalo y las branquias, la actividad de CAT fue uno de los parámetros que más contribuyó en el análisis discriminante (Tabla 18).

Tabla 18- Resultados del análisis discriminante del conjunto de datos de biomarcadores bioquímicos/estrés de branquias, encéfalo e hígado.

Tejido	Parámetro	Pesos de la primera función discriminante	Pesos de la segunda función discriminante	Índice de potencia	% de clasificación correcta
Branquias	GSH	0,0067621	0,0030967	0,0000	87,5
	GST	0,048721	0,025346	0,0022	
	TBARs	-0,021558	0,046665	0,0006	
	ACAP	0,85308	-0,11378	0,6606	
	CAT	0,22673	0,81154	0,1084	
Encéfalo	GSH	-0,0005152	-0,010409	0,0000	65,5
	GST	0,075112	-0,01592	0,0052	
	TBARs	0,11309	0,043015	0,0119	
	ACAP	0,80699	-1,3137	0,7383	
	CAT	0,83107	1,7531	0,8838	
Hígado	GSH	-0,032638	0,004746	0,0010	100
	GST	0,039673	0,069199	0,0017	
	TBARs	-0,0077157	-0,00975	0,0001	
	ACAP	-0,096159	-0,28378	0,0117	
	CAT	0,048245	0,00092536	0,0022	

Discusión

Concentración de ivermectina en condiciones experimentales: agua y sedimentos

Durante el ensayo de estabilidad de IVM en agua, la disminución inicial de la concentración de IVM en el tiempo 0 podría atribuirse a la adsorción en la superficie de vidrio de los acuarios. Según Krogh et al. (2008), la desorción de IVM a sustratos como el vidrio puede ocurrir después de cierto tiempo, siendo que el principal mecanismo de unión y sorción de la IVM es de naturaleza iónica. En este experimento, este efecto se observó luego de las primeras 24 h, acercándose a las concentraciones nominales. Después de las 48 h, como lo han informado varios autores (Rath et al., 2016; Prasse, et al., 2009; Krogh et al., 2008), el decaimiento de la concentración de IVM era esperable. La elección de 48 h como tiempo total de renovación fue coherente con estos hallazgos.

Es esperable que, en las condiciones del ensayo de sedimentos fortificados, la IVM se absorberá fuertemente en el sedimento debido a sus valores de Koc altos, que se reportan en el rango de $1,26 \times 10^4$ a $1,57 \times 10^4$ (Halley et al., 1989; Bloom y Matheson, 1993). Dada la naturaleza hidrofóbica de IVM, tenderá a unirse a la materia orgánica presente principalmente en los sedimentos, por lo que debería formar agregados altamente concentrados dentro del

sustrato (Daoud et al., 2018). Además, no se observó una disminución significativa de la concentración de IVM en los sedimentos, lo que demuestra que la IVM es persistente en los sedimentos durante el tiempo del experimento. Las diferencias observadas entre la concentración nominal y real pueden obedecer principalmente a la variabilidad del método de extracción observada en las determinaciones analíticas y a la cercanía de las concentraciones bajas con los límites de cuantificación. Estas diferencias se mantuvieron en los ensayos en presencia y ausencia de peces. Estos resultados son similares a los informados por Prasse et al. (2009), Mougin et al. (2003) y Davies et al. (1998) para IVM en suelos y sedimentos donde los tiempos de vida media fueron >100 días. Sin embargo, Tolls (2001) no pudo atribuir la afinidad del suelo de IVM exclusivamente a su lipofilicidad. A pesar de la sorción a través de la unión hidrofóbica, se han sugerido otros mecanismos de sorción, por ejemplo, la unión específica de IVM al suelo mediante la formación de complejos o aductos con materia inorgánica inmóvil del suelo (Oppel et al., 2004). Estas hipótesis están respaldadas por datos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), donde la IVM podría formar aductos con cationes como sodio o amonio (Ali et al., 2000).

También se detectaron pequeñas cantidades de IVM (1% de las concentraciones nominales) en MPS que provenían de sedimentos resuspendidos del fondo. La falta de diferencias significativas en la concentración de IVM en acuarios con o sin peces indica que la presencia de peces no fue determinante en la partición de IVM en las diferentes matrices abióticas. Cabe mencionar que las concentraciones de IVM en agua en todos los casos estuvieron por debajo del límite de detección, lo que indica que la transferencia de IVM desde el sedimento hacia el agua no fue evidente. Este patrón también coincidió con los resultados informados por Mesa et al (2020) donde el sedimento y el estiércol de ganado en las llanuras aluviales fueron los reservorios más importantes de IVM.

Efectos de la ivermectina sobre los biomarcadores

Hoy en día, se recomienda una batería de biomarcadores para evaluar los efectos potenciales de los xenobióticos sobre las funciones y procesos celulares, el comportamiento o el daño celular (Götte et al., 2020). Los diseños experimentales ensayados resultaron útiles para establecer los principales efectos de la IVM en *P. lineatus* en diferentes escenarios y tiempos de exposición.

La exposición a IVM en agua permitió evaluar una batería amplia de biomarcadores en diferentes niveles de organización biológica, permitiendo establecer, a través de la estadística multivariada, el grupo o familia de biomarcadores que evidenciaron las mayores respuestas. En

este sentido, los biomarcadores bioquímicos y de comportamiento mostraron efectos significativos incluso en las concentraciones más bajas ensayadas.

En cuanto al tiempo de exposición, podemos concluir que, dado que no se observaron efectos significativos en casi todos los marcadores a los 30 días de exposición (con excepción de GST en branquias), los efectos evidenciados a los 15 días parecen ser transitorios, aunque la prolongación exacta de esa transitoriedad permanece desconocida. Podemos asumir que los peces se encuentran bajo un estrés metabólico durante los primeros 15 días, pero luego existe algún tipo de reajuste o compensación. Otros autores han observado también esta transitoriedad en los efectos metabólicos o de estrés oxidativo luego de la exposición de peces a distintos factores de estrés como el cobre (McKim et al., 1970) o la hiperoxia (Lushchak et al., 2005).

Además de los efectos del tiempo de exposición, la vía de exposición también parece haber tenido efectos diferenciales. En general, la toxicidad de un compuesto está fuertemente influenciada no solo por la cantidad de ese compuesto disponible para un organismo, sino por diversos factores como, por ejemplo, la concentración de oxígeno, el hábitat, la temperatura y la disponibilidad de alimento (Harkey et al., 1994). Esto es coherente con los resultados obtenidos donde, a iguales tiempos de exposición (15 días), los sedimentos fortificados con IVM reportaron efectos en un mayor número de biomarcadores de estrés oxidativo que la exposición a IVM a través del agua. Estas diferencias podrían explicarse por los hábitos tróficos del sábalo. La dieta iliófaga de esta especie consiste en una biopelícula bentónica compuesta por bacterias, algas y materia orgánica no viva presente en los sedimentos (Bowen, 2021). Estos hábitos tróficos podrían ser una vía de ingreso de IVM más directa y en mayor cantidad que el agua a través de las branquias conteniendo IVM en solución.

Efectos de la ivermectina sobre los biomarcadores de estrés oxidativo

Diferentes estudios muestran, y se ha establecido, que la exposición a xenobióticos induce el aumento de EROs desencadenando aumento de respuestas antioxidantes para su neutralización. La intensidad y duración de la exposición puede llevar a la alteración del equilibrio entre EROs, defensas y daño oxidativo (Lushchak, 2011). Birnie-Gauvin et al. (2017) sugirieron que los contaminantes del agua, como IVM, pueden aumentar el daño oxidativo y reducir la efectividad de los sistemas antioxidantes en los peces. Por lo tanto, en esta tesis, TBARs, ACAP, CAT, GSH y GST fueron elegidos como biomarcadores representativos de una variedad de vías bioquímicas importantes en los peces (daño oxidativo, respuesta antioxidante y biotransformación).

La alteración del equilibrio dinámico entre la producción y la eliminación de EROs puede conducir a procesos de peroxidación de los lípidos y daños a los constituyentes celulares vinculados a cambios en los sistemas antioxidantes (Stara et al., 2013). La reacción de los productos de la peroxidación lipídica con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) es uno de los estimadores más utilizados de la peroxidación lipídica causada por estrés oxidativo (Oakes y Van Der Kraak, 2003). Nuestros resultados sugieren que, incluso a una concentración baja, IVM causó daño oxidativo en el tejido cerebral, como lo demuestra el aumento de los niveles de peroxidación de lípidos detectados por TBARS en el ensayo de sedimentos. Sin embargo, la concentración más alta de IVM no promovió la peroxidación lipídica. Efectos similares fueron reportados por Ogueji et al. (2020) en tejidos hepáticos del bagre *Clarias gariepinus*. Estos autores registraron un aumento significativo de la LPO tras 48, 72 y 96 h de exposición a 9 µg/L de IVM. Los mismos autores demostraron que las concentraciones más altas de IVM y el tiempo de exposición no promovían daño a lípidos por peroxidación. Por su parte, puede mencionarse que Ezenwaji et al. (2017) reportaron una reducción en LPO en tejidos de hígado y branquias de *C. gariepinus* expuestos a concentraciones más altas de IVM (0,15 a 0,9 mg/L) durante la duración del experimento (96 h). Sin embargo, una comparación directa debe hacerse con cautela ya que, en ambos trabajos, los autores evidenciaron peroxidación lipídica a tiempos significativamente más cortos de exposición y a concentraciones más altas que las evaluadas en esta tesis.

Las GST son enzimas de fase II del sistema de biotransformación. Pueden catalizar la conjugación de GSH a centros electrofílicos de muchos compuestos tóxicos endógenos o exógenos, generados por la exposición a IVM (Özaslan et al., 2018). Durante los procesos de detoxificación de EROs, el GSH se convierte en glutatión oxidado (GSSG) y, por lo tanto, se vuelve menos disponible para la conjugación con GST. En el presente trabajo, los niveles de GSH en los tejidos branquiales y hepáticos disminuyeron después de la exposición a la concentración más baja de IVM en sedimentos. Además, la concentración más alta de IVM también mostró una caída significativa de los niveles de GSH en el tejido hepático. Esta caída sugiere que se ha ejercido una respuesta de biotransformación, en la que el GSH se utiliza para la conjugación de la IVM mediada por GST. Este proceso de biotransformación de la IVM podría explicar la ausencia de daño oxidativo en estos tejidos. Por otro lado, una reducción de los niveles de GSH sugiere una disminución en la componente no enzimática del sistema de defensa antioxidante del organismo. A pesar de estos resultados, con excepción de lo observado en el hígado en el ensayo de sedimentos en la concentración más baja de IVM, la disminución de los niveles de GSH parece no haber afectado significativamente la actividad de GST en ninguna concentración.

o tejido, contrario a lo observado por Oliveira et al. (2016) y Serafini et al. (2019). Sin embargo, la respuesta fisiológica completa del organismo al fármaco siempre es difícil de predecir; la “ventana de inducción” del GST puede haber ocurrido días antes o aún estar por ocurrir (Oliveira et al., 2016).

CAT es una enzima antioxidante implicada en la respuesta a EROs, más concretamente frente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En la exposición a sedimentos, la actividad de CAT en el tejido hepático aumentó después de la exposición a la concentración más baja de IVM. La actividad de CAT puede haber aumentado debido a la presencia intracelular del H_2O_2 (Campos-Shimada et al., 2018). Ogueji et al. (2020) también detectaron un aumento en la actividad CAT hepática en *C. gariepinus* asociado con la exposición a IVM. Estos autores sugirieron que el aumento puede ser un ajuste para defender a los organismos de la toxicidad de los radicales libres inducida por IVM (Ogueji et al., 2020). Además, en el análisis multivariado, la actividad de CAT mostró un índice de potencia alto en los tejidos cerebrales y branquiales, lo que indica que CAT desempeñó un papel importante en el análisis de clasificación cruzada correcta.

Se detectó una disminución significativa en los niveles de fluorescencia relativa en el estudio de ACAP, tanto en las branquias para las dos concentraciones de IVM como en el hígado en la concentración más baja de IVM. Por otro lado, ACAP juega un papel clave en el análisis de clasificación cruzada correcta, mostrando el índice de potencia más alto en todos los tejidos. Autores anteriores (Amado et al., 2009; Vinagre et al., 2003), sugirieron que una disminución en los niveles de fluorescencia relativa en la técnica de ACAP puede interpretarse como una competencia antioxidante aumentada y podría atribuirse a un tipo de respuesta compensatoria.

Serafini et al. (2019) informaron una disminución similar en los niveles de ACAP después de una exposición aguda del bagre *Rhamdia quelen* a otra avermectina semisintética, la eprinomectina. Estos autores encontraron resultados similares en tejido hepático con la mayor concentración de eprinomectina (3,976 $\mu\text{g/L}$) y demostraron que esta respuesta no regresaba a los niveles de control después del período de recuperación de 48 h.

Las alteraciones de la actividad de la AChE en los peces se utilizan con frecuencia como biomarcadores y se conocen como un método rápido para las evaluaciones ecotoxicológicas (Umar y Aisami, 2020; Fu et al., 2018). En este estudio se observó una inhibición significativa de la actividad de AChE muscular en ambos tratamientos con IVM en sedimentos. La inhibición de AChE es, de hecho, un biomarcador tradicional de plaguicidas organofosforados, piretroides, metales pesados y carbamatos (Brodeur et al., 2017; Modesto y Martinez, 2010; Monserrat et al., 2002; Fulton y Key, 2001). La sensibilidad de AChE puede variar significativamente entre

especies; siendo el cerebro y el musculo los tejidos con frecuencia más evaluados (Sancho et al., 2000). Hasta donde sabemos, este es el primer informe de inhibición de AChE en tejido muscular de peces expuestos a IVM. Un factor importante para considerar es que la butirilcolinesterasa muscular en peces puede hidrolizar en cierta medida el sustrato de AChE (Albendín et al., 2017), por lo que la actividad registrada de AChE en músculo puede integrar la respuesta de una variedad de colinesterasas distintas. Es importante señalar que la acumulación de acetilcolina por reducción de la actividad enzimática puede afectar las respuestas de escape y el comportamiento reproductivo de los peces (Bretaud et al., 2000; Saglio y Trijasse, 1998), interfiriendo directamente en la supervivencia de la especie (Modesto y Martínez, 2010).

Efectos de la ivermectina sobre biomarcadores comportamentales

Los efectos generales de IVM en el rendimiento de natación de los peces se detectaron mediante análisis discriminante. Específicamente, la natación de rutina y la velocidad máxima de escape parecieron ser los indicadores más afectados incluso con la concentración más baja de IVM en agua (0,5 µg/L). Como mencionan Weis y Candello (2012), estos parámetros podrían estar directamente relacionados con la capacidad de escapar/evitar depredadores y, por lo tanto, el impacto ecológico de los cambios en este comportamiento sería aún mayor. La disminución en la capacidad para evitar a los depredadores puede aumentar las tasas de mortalidad y afectar el tamaño y la estructura de tamaño de la población. Las presas expuestas a contaminantes como la IVM pueden fallar en la detección de depredadores, correr más riesgos al dejar el refugio para encontrar comida y tener un bajo rendimiento de arranque rápido, resistencia reducida, incapacidad para la formación de cardúmenes, patrones de actividad alterados y aumento de la visibilidad (hiperactividad), todo lo que conduce a mayor vulnerabilidad de los depredadores (Scott y Sloman, 2004).

Aunque estos estudios brindan información importante sobre las exposiciones a contaminantes que podrían tener efectos ecológicos, no arrojan luz sobre los posibles mecanismos de comportamiento a través de los cuales los contaminantes podrían alterar los sistemas de interacción depredador-presa. La evasión a depredadores implica un conjunto complejo de comportamientos. Las respuestas conductuales a las primeras señales de advertencia de riesgo de depredación (ya sea química o visual) pueden verse afectadas por una interrupción de los sistemas sensoriales o la motivación para responder adecuadamente (Scott y Sloman, 2004).

Los efectos de IVM en el rendimiento de natación de los peces también se observaron en estudios anteriores. Oliveira et al. (2016) y Domingues et al. (2016) reportaron alteraciones de comportamiento en *D. rerio* incluyendo movimiento lento y nado errático con períodos de

parálisis en concentraciones entre 0.25 a 200 µg/L. Efectos similares fueron informados por Bard y Gadbois (2007) y Mladineo et al. (2006) en evaluaciones a corto plazo de los efectos conductuales de IVM en *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766) y *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), respectivamente. En ambos estudios, los peces expuestos mostraron alteraciones en el comportamiento, incluidos letargo, cambios posturales y pérdida de actividad. Además, la administración de IVM a través del alimento a juveniles de *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) provocó efectos similares: movilidad reducida y mayor tiempo para completar la alimentación (Ucan-Marín et al., 2012). Estos cambios de comportamiento son similares a los descritos para los agentes anticolinérgicos, lo que sugeriría que la AChE también puede verse afectada. Si bien, en nuestras condiciones experimentales, los resultados de AChE cerebral no permitieron establecer tal asociación, si lo hizo en cambio la actividad de AChE muscular en el ensayo de sedimentos. Alternativamente, en los vertebrados, la IVM se dirige a los canales de cloruro del receptor GABA, lo que lleva a la hiperpolarización del potencial de membrana y a la reducción de la transmisión nerviosa (Stevens y Breckenridge 2001). Dado que los canales del receptor GABA se encuentran principalmente en el sistema nervioso central y dado que la barrera hematoencefálica en los peces no parece ser lo suficientemente efectiva para evitar que la IVM se acumule en el cerebro, como sugiere Horsberg (2012), Katharios et al. (2004) y Høy et al. (1990), una posible explicación de estos efectos es que la IVM puede llegar al cerebro, afectando el sistema nervioso central y, en consecuencia, provocando cambios de comportamiento.

Efectos de la ivermectina sobre biomarcadores hematológicos

Los parámetros hematológicos se pueden utilizar como índices del estado de salud para detectar la posible respuesta al estrés en los peces (Oliveira et al., 2019). Pocos estudios han considerado parámetros hematológicos para analizar los efectos toxicológicos de IVM. Katharios et al. (2002) informaron una disminución en el hematocrito y un aumento en los niveles de glucosa y hemoglobina con dosis altas de IVM inyectadas por vía intraperitoneal (100-800 µg/Kg de peso corporal) en *S. aurata*. Peng et al. (2012) estudiaron la influencia de IVM en los parámetros sanguíneos de *Carassius auratus* después de la administración oral. Sin embargo, no encontraron efectos significativos asociados a la IVM en ningún parámetro sanguíneo, al igual que Madrid et al. (2021), que reportaron que altas concentraciones de IVM causaron efectos débiles o nulos en los parámetros sanguíneos en el pez amazónico *Corydoras schwanzi* Rössel, 1963. De igual forma, los resultados obtenidos en el presente estudio no mostraron una respuesta significativa de los parámetros sanguíneos de *P. lineatus* expuestos a IVM a las concentraciones ensayadas. Además, el análisis discriminante reporta el menor porcentaje de

clasificación correcta indicando que este grupo de biomarcadores no discrimina bien entre tratamientos.

Integración de los efectos de la ivermectina sobre los biomarcadores

Los resultados obtenidos del análisis de biomarcadores de comportamiento, hematología y bioquímica se integraron mediante análisis multivariado. Un biomarcador único y aislado no es suficiente para reflejar el estado de salud de un organismo, por lo que utilizar una gran batería de biomarcadores de diferentes niveles de organización es más apropiado para evaluar los efectos toxicológicos de los xenobióticos (Beliaeff y Burgeot, 2002). Para identificar la contribución del grupo de parámetros que fueron importantes para describir los efectos globales en *P. lineatus*, se utilizó una función discriminante con un análisis de clasificación cruzada correcta (Ghisi et al., 2017). En estos análisis, los biomarcadores bioquímicos en hígado y branquias mostraron el porcentaje más alto de clasificación correcta, seguidos por los biomarcadores comportamentales. Un alto valor de clasificación correcta indica que la mayoría de los individuos se clasificaron correctamente en sus tratamientos considerando estos conjuntos de datos por separado. Una confirmación de que la asignación correcta/exitosa fue significativamente más alta de lo probable por casualidad fueron los altos valores del estadístico Kappa de Cohen. Además, el interés radicó en encontrar los biomarcadores que jugaran un mayor papel en la discriminación, lo que se logró a través del índice de potencia. Este índice es una medida agregativa porque resume la información de las diferentes funciones canónicas. Un índice de potencia alto significa que estas variables son las que más contribuyen al análisis de discriminación entre los tratamientos. El ACAP y CAT mostraron elevados valores de este índice en diferentes ensayos, sugiriendo una alta contribución a los efectos. Entre los marcadores comportamentales, la natación de rutina y la velocidad de escape fueron los parámetros que más contribuyeron al análisis. Individualmente, estos parámetros no siempre mostraron diferencias significativas en el análisis ANOVA a pesar de mostrar tendencias no significativas.

Representatividad de los diseños experimentales

A pesar del uso a gran escala, las concentraciones ambientales de IVM en el agua son muy variables (Liebig et al. 2010). Ambas concentraciones ensayadas (0,5 y 1,5 $\mu\text{g/L}$) parecen ser altas en comparación con las concentraciones ambientales previstas (PEC) de 0,2–2,5 ng/L calculadas por Liebig et al. (2010) para aguas superficiales cercanas a sitios de pastoreo de animales. Además, Metcalfe et al. (2008) determinaron una PEC de 13 ng/L para aguas superficiales. Sin embargo, debido a que la IVM es altamente hidrofóbica, se elimina rápidamente de la fase acuosa y podría acumularse en la materia orgánica suspendida y/o en la columna de agua (Liebig et al., 2010; Kövecses y Marcogliese, 2005). En consecuencia, cuerpos

de agua con altos niveles de materia orgánica en suspensión, como los ríos Paraná y Uruguay de la cuenca del Río de la Plata (Bergamino et al., 2017; Drago, 2007), presentarían concentraciones más altas de IVM en el agua. En este sentido, y con valores más próximos a los ensayados en la presente tesis, Mesa et al. (2020) reportaron valores de 1,24 µg/Kg IVM en agua (en el material particulado en suspensión) de lagunas de la planicie de inundación del río Paraná adyacentes a zonas de cría de ganado. Como se mencionó anteriormente, estas llanuras aluviales juegan un papel clave en la dinámica poblacional y los procesos de reclutamiento de *P. lineatus* (Lozano et al., 2019). Por lo tanto, las concentraciones utilizadas en los ensayos subcrónicos con IVM en agua y el estadio seleccionado de *P. lineatus* para este experimento representan un escenario ambiental probable.

Como se mencionara previamente, *P. lineatus* es una especie iliófaga que se nutre de los sedimentos y la biopelícula bentónica (Bowen, 2021). Estos hábitos tróficos podrían ser una vía directa para la ingesta de IVM de los sedimentos. En particular, el estudio con sedimentos contaminados tiene la intención de imitar lo que les ocurriría a los juveniles de *P. lineatus* si permanecen en las lagunas de la planicie de inundación donde se cría el ganado tratado con IVM. Considerando los sedimentos como fuente de contaminación y el hábito trófico de *P. lineatus*, los resultados del presente estudio son compatibles con un escenario de exposición natural y realista de IVM en ambientes acuáticos como los humedales.

Bibliografía

- Adams, S. M., Shepard, K. L., Greeley, M. S., Jimenez, B. D., Ryon, M. G., Shugart, L. R., McCarthy, J. F., Hinton, D. E. (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research*, 28(1), 459-464. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(89\)90284-5](https://doi.org/10.1016/0141-1136(89)90284-5)
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar, M., Raisuddin, S. (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1523(1), 37-48. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00098-2)
- Albendín, G., Arellano, J. M., Manuel-Vez, M. P., Sarasquete, C., Arufe, M. I. (2017). Characterization and *in vitro* sensitivity of cholinesterases of gilthead seabream (*Sparus aurata*) to organophosphate pesticides. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(2), 455-464. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0299-y>

Ali, M. S., Sun, T., McLeroy, G. E., Phillippo, E. T. (2000). Confirmation of Eprinomectin, Moxidectin, Abamectin, Doramectin, and Ivermectin in Beef Liver by Liquid Chromatography/Positive Ion Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 83(1), 39-52. <https://doi.org/10.1093/jaoac/83.1.39>

Allin, C. J., Wilson, R. W. (2000). Effects of pre-acclimation to aluminium on the physiology and swimming behaviour of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during a pulsed exposure. *Aquatic Toxicology*, 51(2), 213-224. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00111-9)

Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Yunes, J. S., Monserrat, J. M. (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxyl radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of The Total Environment*, 407(6), 2115-2123. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>

Amiard-Triquet, C., Jean-Claude, A., Rainbow, P.S. (2013). *Ecological Biomarkers Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press, U.S. 434 p.

Asada, K., Takahashi, M. (1987). Production and Scavenging of Active Oxygen in Photosynthesis. En: D. J. Kyle, C. B. Osmond y C. J. Arntzen (Eds.), *Photoinhibition Topics in Photosynthesis*, Vol. 9, Elsevier, Amsterdam, pp. 227-287.

Au, D. W. T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9), 817-834. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.032>

Bagenal, T. B., Tesch, F. W. (1978). Methods for assessment of fish production in fresh waters. En: Bagenal, T.B. (Ed), *Age and growth*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 101-136.

Banas, D., Voltaire, Y., Danger, M., Thomas, M., Oliveira-Ribeiro, C. A., Roche, H., Ledore, Y. (2009). Can we use stable isotopes for ecotoxicological studies? Effect of DDT on isotopic fractionation in *Perca fluviatilis*. *Chemosphere*, 76(6), 734-739. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.033>

Bard, S. M., Gadbois, S. (2007). Assessing neuroprotective P-glycoprotein activity at the blood-brain barrier in killifish (*Fundulus heteroclitus*) using behavioural profiles. *Marine Environmental Research*, 64(5), 679-682. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.05.001>

Barišić, J., Dragun, Z., Ramani, S., Filipović Marijić, V., Krasnići, N., Čož-Rakovac, R., Kostov, V., Rebok, K., Jordanova, M. (2015). Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as an indicator of river pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, 158-166. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.027>

Bartell, S. M., Gardner, R. H., O'Neill, R. V. (1992). *Ecological Risk Estimation*. Michigan: Lewis.

Beliaeff, B., Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6), 1316-1322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>

Bergamino, L., Schuerch, M., Tudurí, A., Carretero, S., García-Rodríguez, F. (2017). Linking patterns of freshwater discharge and sources of organic matter within the Río de la Plata estuary and adjacent marshes. *Marine and Freshwater Research*, 68(9), 1704-1715. <https://doi.org/10.1071/MF16286>

Beutler, E. (1982). Catalase. En: Beutler, E. (Ed.), *Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Straton, Inc, New York, pp. 105–106.

Binelli, A., Provini, A. (2003). The PCB pollution of Lake Iseo (N. Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. *Chemosphere*, 53(2), 143-151. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00441-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00441-7)

Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., Willmore, W. G. (2017). A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish and Fisheries*, 18(5), 928-942. <https://doi.org/10.1111/faf.12215>

Blaxhall, P. C. (1972). The haematological assessment of the health of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 4(4), 593-604. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1972.tb05704.x>

Bloom, R. A., Matheson, J. C. (1993). Environmental assessment of avermectins by the US food and drug administration. *Veterinary Parasitology*, 48(1), 281-294. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90163-H](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90163-H)

Borgå, K., Gabrielsen, G. W., Skaare, J. U. (2001). Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution*, 113(2), 187-198. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00171-8](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00171-8)

Bowen, S. H. (2021). Digestion and assimilation of benthic biofilm by the Sábalo, *Prochilodus lineatus*. *Journal of Fish Biology*, 100(1), 107-116. <https://doi.org/10.1111/jfb.14924>

Boyland, E., Chasseaud, L. F. (1969). The Role of Glutathione and Glutathione S-Transferases in Mercapturic Acid Biosynthesis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (pp. 173-219). <https://doi.org/10.1002/9780470122778.ch5>

Bretaud, S., Toutant, J. P., Saglio, P. (2000). Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(2), 117-124. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1954>

Brewer, S. K. , Little, E. E., DeLonay, A. J., Beauvais, S. B., Jones, S. B. (1999). The use of automated monitoring to assess behavioral toxicology in fish. Linking behavior and physiology. En: D.S. Henshel, M. C. Black, y M. C. Harrass (eds), *Environmental Toxicology and Risk Assessment 8th Volume*. ASTM STP 1364. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA.

Britto, R. S., Garcia, M. L., Martins da Rocha, A., Flores, J. A., Pinheiro, M. V. B., Monserrat, J. M., Ferreira, J. L. R. (2012). Effects of carbon nanomaterials fullerene C60 and fullerol C60(OH)18–22 on gills of fish *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) exposed to ultraviolet radiation. *Aquatic Toxicology*, 114, 80-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.018>

Brodeur, J. C., Sanchez, M., Castro, L., Rojas, D. E., Cristos, D., Damonte, M. J., Poliserpi, M. B., D'Andrea, M. F., Andriulo, A. E. (2017). Accumulation of current-use pesticides, cholinesterase inhibition and reduced body condition in juvenile one-sided livebearer fish (*Jenynsia multidentata*) from the agricultural Pampa region of Argentina. *Chemosphere*, 185, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.129>

Brookes, P. S. (2005). Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(1), 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.016>

Brown, D., 2013. Tracker (version 5.1.5). <https://physlets.org/tracker/>.

Burkina, V., Zlabek, V., Zamaratskaia, G. (2013). Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent in vitro inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. *Chemosphere*, 92(9), 1099-1104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.050>

Burkina, V. (2014). Pharmaceuticals in the aquatic environment and their effects in fish. Ph.D. thesis, USB FFPW, RIFCH, Vodňany, 126 pages.

Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. Annual review of biochemistry, 58(1), 79-110.

Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. BioFactors, 6(4), 391-397. <https://doi.org/10.1002/biof.5520060404>

Cairns, J., Pratt, J. R. (1989). The scientific basis of bioassays. Hydrobiologia, 188(1), 5-20. <https://doi.org/10.1007/BF00027769>

Caldwell, C. A., Hinshaw, J. (1994). Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. Aquaculture, 126(1), 183-193. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90259-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90259-3)

Campbell, T.W. (2004). Hematology of lower vertebrates. 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVPC) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), ACVP and ASVCP (Eds.). USA.

Campos-Shimada, L. B., Hideo Gilglioni, E., Fernandes Garcia, R., Rizato Martins-Maciél, E., Luiza Ishii-Iwamoto, E., Luzia Salgueiro-Pagadigorria, C. (2018). Superoxide dismutase: a review and a modified protocol for activities measurements in rat livers. Archives of Physiology and Biochemistry, 1-8. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1520891>

Carlson, R. W., Bradbury, S. P., Drummond, R. A., Hammermeister, D. E. (1998). Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals. Aquatic Toxicology, 43(1), 51-68. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00097-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00097-0)

Castillo, M.G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones / Gabriela Castillo (ed.). - México: IMTA, 2004.

Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M. J., Scarabotti, P. A., Wunderlin, D. A. (2009). Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). Environmental Pollution, 157(11), 3025-3033. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.055>

Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F. (2003). Fish as bioindicators. En: B. A. Markert, A. M. Breure y H.G. Zechmeister (Eds.), Trace metals and other contaminants in the environment, Vol. 6, pp. 639-676, Elsevier.

Clauss, T. M., Dove, A. D. M., Arnold, J. E. (2008). Hematologic Disorders of Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 445-462. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.007>

Cleveland, L., Little, E. E., Ingersoll, C. G., Wiedmeyer, R. H., Hunn, J. B. (1991). Sensitivity of brook trout to low pH, low and elevated aluminum concentrations during laboratory pulse exposures. *Aquatic Toxicology*, 19(4), 303-317. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90055-E](https://doi.org/10.1016/0166-445X(91)90055-E)

Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sostoa, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A. (2016). Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of The Total Environment*, 540, 307-323. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.099>

Cruz, A. L. d., Prado, T. M., Maciel, L. A. d. S., Couto, R. D. (2015). Environmental effects on the gills and blood of *Oreochromis niloticus* exposed to rivers of Bahia, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.022>

Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M. Á. (2011). Immunotoxicological effects of environmental contaminants in teleost fish reared for aquaculture. En: Stoytcheva M. (ed.), *Pesticides in the Modern World-Risks and Benefits*, 241-266, Rijeka, Croatia.

Daoud, D., McCarthy, A., Dubetz, C., Barker, D. E. (2018). The effects of emamectin benzoate or ivermectin spiked sediment on juvenile American lobsters (*Homarus americanus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 636-645. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.075>

Davico, C. E., Loteste, A., Parma, M. J., Poletta, G., Simoniello, M. F. (2020). Stress oxidative and genotoxicity in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) exposed to commercial formulation of insecticide cypermethrin. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(1), 79-84. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1497643>

Davies, I. M., Gillibrand, P. A., McHenery, J. G., Rae, G. H. (1998). Environmental risk of ivermectin to sediment dwelling organisms. *Aquaculture*, 163(1-2), 29-46. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00211-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00211-7)

De Boeck, G., Vlaeminck, A., Balm, P. H. M., Lock, R. A. C., De Wachter, B., Blust, R. (2001). Morphological and metabolic changes in common carp, *Cyprinus carpio*, during short-term

copper exposure: Interactions between Cu^{2+} and plasma cortisol elevation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2), 374-381. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200219>

Dell'Omo, G. 2002. *Behavioural Ecotoxicology*. J Wiley & Sons, Chichester, UK

DeNiro, M. J., Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(5), 495-506. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(78\)90199-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(78)90199-0)

Deniro, M. J., Epstein, S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45(3), 341-351. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(81\)90244-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(81)90244-1)

Depledge M. 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. En: M. C. Fossi y C. Leonzio, (eds), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, Lewis Publishers, Baton Raton, FL, USA, pp 272–95.

Domingues, I., Oliveira, R., Soares, A. M. V. M., Amorim, M. J. B. (2016). Effects of ivermectin on *Danio rerio*: a multiple endpoint approach: behaviour, weight and subcellular markers. *Ecotoxicology*, 25(3), 491-499. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1607-5>

dos Santos Miron, D., Crestani, M., Rosa Shettinger, M., Maria Morsch, V., Baldisserotto, B., Angel Tierno, M., Moraes, G., Vieira, V. L. P. (2005). Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(3), 398-403. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.019>

Doucett, R. R., Booth, R. K., Power, G., McKinley, R. K. (1999). Effects of the spawning migration on the nutritional status of anadromous Atlantic salmon (*Salmo salar*): insights from stable-isotope analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(11), 2172-2180. <https://doi.org/10.1139/f99-147>

Drago, E. C. (2007). The physical dynamics of the river–lake floodplain system En: M. H. Iriondo, J. C. Paggi y M. J. Parma (Eds.), *The Middle Paraná River: limnology of a subtropical wetland*, pp. 83-122, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Dutta, H. M., Arends, D. A. (2003). Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental Research*, 91(3), 157-162. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(02\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(02)00062-2)

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics, 82(1), 70-77.

Ezenwaji, N. E., ConstanceUkwuoma, C., Nwani, C. D., Ivoke, N., Onyekachi, J. (2017). The effect of short term treatment with ivermectin on the oxidative stress parameters in the tissues of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), juvenile. International Journal of Aquatic Science, 8(1), 41-50.

Fanta, E., Rios, F. S. A., Romão, S., Vianna, A. C. C., Freiburger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicology and Environmental Safety, 54(2), 119-130. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00044-1)

Fent, K. (2004). Ecotoxicological effects at contaminated sites. Toxicology. 205: 223-240.

Fernandes, M. N., Mazon, A. F. (2003). Environmental pollution and fish gill morphology, pp. 203-231. En: A. L. Val y B. G. Kapoor (eds.), Fish Adaptations, Science Pub Inc., Enfield, USA.

Fonseca, A. R., Sanches Fernandes, L. F., Fontainhas-Fernandes, A., Monteiro, S. M., Pacheco, F. A. L. (2016). From catchment to fish: Impact of anthropogenic pressures on gill histopathology. Science of The Total Environment, 550, 972-986. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.199>

Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. Journal of Experimental Biology, 201(8), 1203-1209. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.8.1203>

Froese, R., Pauly, D. (Editores). (2022). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (08/2022).

Fu, H., Xia, Y., Chen, Y., Xu, T., Xu, L., Guo, Z., Xu, H., Xie, H. Q., Zhao, B. (2018). Acetylcholinesterase Is a Potential Biomarker for a Broad Spectrum of Organic Environmental Pollutants. Environmental Science & Technology, 52(15), 8065-8074. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04004>

Fuiman, L. A., Smith, M. E., Malley, V. N. (1999). Ontogeny of routine swimming speed and startle responses in red drum, with a comparison of responses to acoustic and visual stimuli. Journal of Fish Biology, 55, 215-226. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb01057.x>

Fulton, M. H., Key, P. B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects.

Environmental Toxicology and Chemistry, 20(1), 37-45.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>

Gabriel, U., Ezeri, G., Opabunmi, O. (2004). Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch, 1822). African Journal of Biotechnology, 3(9).

Gebauer, G., Schulze, E. D. (1991). Carbon and nitrogen isotope ratios in different compartments of a healthy and a declining *Picea abies* forest in the Fichtelgebirge, NE Bavaria. Oecologia, 87(2), 198-207. <https://doi.org/10.1007/BF00325257>

Gerhardt, A. (2007). Aquatic Behavioral Ecotoxicology—Prospects and Limitations. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 13(3), 481-491. <https://doi.org/10.1080/10807030701340839>

Gernhöfer, M., Pawert, M., Schramm, M., Müller, E., Triebkorn, R. (2001). Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, 8(3), 241-260. <https://doi.org/10.1023/A:1012958804442>

Ghisi, N. C., Oliveira, E. C., Guiloski, I. C., de Lima, S. B., Silva de Assis, H. C., Longhi, S. J., Prioli, A. J. (2017). Multivariate and integrative approach to analyze multiple biomarkers in ecotoxicology: A field study in Neotropical region. Science of The Total Environment, 609, 1208-1218. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.266>

Girón-Pérez, M. I., Montes-López, M., García-Ramírez, L. A., Romero-Bañuelos, C. A., Robledo-Marenco, M. L. (2008). Effect of Sub-lethal Concentrations of Endosulfan on Phagocytic and Hematological Parameters in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 80(3), 266-269. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9358-0>

Golovina, N. A., Trombicky, I. D. (1989). Haematology of pond fish. Kishinev, Shtiinca, 158.

Golovina, N.A. (1996). Morphofunctional characteristics of the blood of fish as objects of aquiculture. Doctoral thesis. Moscow, pp.53.

Götte, J. Y., Carrizo, J. C., Panzeri, A. M., Amé, M. V., Menone, M. L. (2020). Sublethal effects of carbendazim in *Jenynsia multidentata* detected by a battery of molecular, biochemical and genetic biomarkers. Ecotoxicology and Environmental Safety, 205, 111157. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111157>

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)

Halley, B. A., Jacob, T. A., Lu, A. Y. H. (1989). The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate. *Chemosphere*, 18(7), 1543-1563. [http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535\(89\)90045-3](http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(89)90045-3)

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*, 5° ed. Oxford: Clarendon Press.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.

Harkey, G. A., Landrum, P. F., Klaine, S. J. (1994). Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(8), 1315-1329. <https://doi.org/10.1002/etc.5620130814>

Hartl, M. G. (2002). Benthic fish as sentinel organisms of estuarine sediment toxicity. *The Vienna School of Marine Biology: A Tribute to Jörg Ott*. Facultas Universitätsverlag, Wien, 89-100.

Hatfield, C. T., Anderson, J. M. (1972). Effects of Two Insecticides on the Vulnerability of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Parr to Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) Predation. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 29(1), 27-29. <https://doi.org/10.1139/f72-004>

Hellou, J. (2011). Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2>

Hermes-Lima, M., Willmore, W. G., Storey, K. B. (1995). Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xlenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(3), 271-280. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00020-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00020-X)

Hinton, D. E., Laurén, D. J. (1990). Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. Pp. 51-65. En: J. F. McCarthy y L. R. Shugart (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton, Lewis Publishers.

Hinton, D. E., Baumann, P. C., Gardner, G. R., Hawkins, W. E., Hendricks, J. D., Murchelano, R. A., Okihira, M. S. (1992). Histopathologic biomarkers. En: R. Hugget, R. Kimerle,

P. Mehrle y H. Bergman (Eds.). Biomarkers – biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Lewis Publishers, pp.155-195.

Hofmann, D., Jung, K., Bender, J., Gehre, M., Schüürmann, G. (1997). Using Natural Isotope Variations of Nitrogen in Plants as an Early Indicator of Air Pollution Stress. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(8), 855-863. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199708\)32:8<855::AID-JMS544>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199708)32:8<855::AID-JMS544>3.0.CO;2-J)

Hook, S. E., Gallagher, E. P., Batley, G. E. (2014). The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10(3), 327-341. <https://doi.org/10.1002/ieam.1530>

Horsberg, T. E. (2012). Avermectin Use in Aquaculture. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(6), 1095-1102. <https://doi.org/10.2174/138920112800399158>

Houston, A.H. (1990). Blood and circulation. En: C.B. Schreck, y P.B. Moyle (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD.

Houston, A. H., Roberts, W. C., Kennington, J. A. (1996). Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(6), 481-489. <https://doi.org/10.1007/BF01874922>

Hoyle, I., Shaw, B. J., Handy, R. D. (2007). Dietary copper exposure in the African walking catfish, *Clarias gariepinus*: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 83(1), 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.014>

Høy, T., Horsberg, T. E., Nafstad, I. (1990). The Disposition of Ivermectin in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Pharmacology & Toxicology*, 67(4), 307-312. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1990.tb00835.x>

Hrubec, T. C., Smith, S. A., Robertson, J. L. (2001). Age-Related Changes in Hematology and Plasma Chemistry Values of Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Veterinary Clinical Pathology*, 30(1), 8-15. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2001.tb00249.x>

Huang, P., Feng, L., Oldham, E. A., Keating, M. J., Plunkett, W. (2000). Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*, 407(6802), 390-395. <https://doi.org/10.1038/35030140>

Iwama, G. K., Greer, G. L., Larkin, P. A. (1976). Changes in Some Hematological Characteristics of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Response to Acute Exposure to

Dehydroabietic Acid (DHAA) at Different Exercise Levels. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 33(2), 285-289. <https://doi.org/10.1139/f76-041>

Janssen, C. R., Rodrigo, M. D. F., Persoone, G. (1993). Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. En: J. J. Gilbert, E. Lubzens y M. R. Miracle (eds), Rotifer Symposium VI. Developments in Hydrobiology, vol 83. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1606-0_3

Jardine, T. D., Gray, M. A., McWilliam, S. M., Cunjak, R. A. (2005). Stable Isotope Variability in Tissues of Temperate Stream Fishes. Transactions of the American Fisheries Society, 134(5), 1103-1110. <https://doi.org/10.1577/T04-124.1>

Jardine, T. D., Kidd, K. A., Fisk, A. T. (2006). Applications, Considerations, and Sources of Uncertainty When Using Stable Isotope Analysis in Ecotoxicology. Environmental Science & Technology, 40(24), 7501-7511. <https://doi.org/10.1021/es061263h>

Johnson, L. L., Stehr, C. M., Olson, O. P., Myers, M. S., Pierce, S. M., Wigren, C. A., McCain, B. B., Varanasi, U. (1993). Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. Environmental Science & Technology, 27(13), 2759-2771.

Kane, A., Salierno, J., Brewer, S. (2005). Fish models in behavioral toxicology: automated techniques, updates and perspectives. Methods in aquatic toxicology, 2, 559-590.

Kania, H. J., O'Hara, J. (1974). Behavioral Alterations in a Simple Predator-Prey System Due to Sublethal Exposure to Mercury. Transactions of the American Fisheries Society, 103(1), 134-136. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1974\)103<134:BAIASP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1974)103<134:BAIASP>2.0.CO;2)

Karlsson, L. (1983). Gill morphology in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). Journal of Fish Biology, 23(5), 511-524. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1983.tb02931.x>

Katharios, P., Iliopoulou-Georgudaki, J., Kapata-Zoumbos, K., Spiropoulos, S. (2002). Toxicity of intraperitoneally injected ivermectin in sea bream, *Sparus aurata*. Fish Physiology and Biochemistry, 25(2), 99-108. <https://doi.org/10.1023/a:1020574810332>

Katharios, P., Pavlidis, M., Iliopoulou-Georgudaki, J. (2004). Accumulation of ivermectin in the brain of sea bream, *Sparus aurata* after intraperitoneal administration. Environmental Toxicology and Pharmacology, 17(1), 9-12. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.01.003>

Keenleyside, M. H. A. (1979). Diversity and adaptation in fish behavior. En: Zoophysiology Vol XI. Springer-Verlag, Berlin.

Kleerekoper, H., Westlake, G. F., Matis, J. H., Gensler, P. J. (1972). Orientation of Goldfish (*Carassius auratus*) in Response to a Shallow Gradient of a Sublethal Concentration of Copper in an Open Field. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 29(1), 45-54. <https://doi.org/10.1139/f72-006>

Kori-Slakpere, O. (1985). Haematological characteristics of *Clarias isheriensis* Sydenham. Journal of Fish Biology, 27(3), 259-263. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1985.tb04026.x>

Kosower, N. S., Kosower, E. M. (1978). The Glutathione Status of Cells. International Review of Cytology, 54, 109-160. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60166-7](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60166-7)

Kövecses, J., Marcogliese, D. (2005). Avermectins, Potential Environmental Risks and Impacts on Freshwater Ecosystems in Québec: [Montréal]: Environment Canada, St. Lawrence Centre.

Krall, J., Speranza, M. J., Lynch, R. E. (1991). Paraquat-resistant HeLa cells: Increased cellular content of glutathione peroxidase. Archives of biochemistry and biophysics, 286(2), 311-315. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90045-K](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90045-K)

Krogh, K. A., Søbørg, T., Brodin, B., Halling-Sørensen, B. (2008). Sorption and Mobility of Ivermectin in Different Soils. Journal of Environmental Quality, 37(6), 2202-2211. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0592>

Kwak, I.-S., Chon, T.-S., Kang, H.-M., Chung, N.-I., Kim, J.-S., Koh, S. C., Lee, S.-K., Kim, Y.-S. (2002). Pattern recognition of the movement tracks of medaka (*Oryzias latipes*) in response to sub-lethal treatments of an insecticide by using artificial neural networks. Environmental Pollution, 120(3), 671-681. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00183-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00183-5)

Laurent, P., Perry, S. F. (1991). Environmental Effects on Fish Gill Morphology. Physiological Zoology, 64(1), 4-25. <https://doi.org/10.1086/physzool.64.1.30158511>

Lee, S.-B., Choi, J. (2006). Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). Environmental Toxicology and Chemistry, 25(11), 3006-3014. <https://doi.org/10.1897/05-601r1.1>

Liebig, M., Fernandez, Á. A., Blübaum-Gronau, E., Boxall, A., Brinke, M., Carbonell, G., Egeler, P., Fenner, K., Fernandez, C., Fink, G., Garric, J., Halling-Sørensen, B., Knacker, T., Krogh, K. A., Küster, A., Löffler, D., Cots, M. Á. P., Pope, L., Prasse, C., Römbke, J., Rönnefahrt, I.,

Schneider, M. K., Schweitzer, N., Tarazona, J. V., Ternes, T. A., Traunspurger, W., Wehrhan, A., Duis, K. (2010). Environmental risk assessment of ivermectin: A case study. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6(S1), 567-587. <https://doi.org/10.1002/ieam.96>

Linde-Arias, A. R., Inácio, A. F., Novo, L. A., de Albuquerque, C., Moreira, J. C. (2008). Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environmental Pollution*, 156(3), 974-979. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.05.006>

Liska, D., Lyon, M., Jones, D. S. (2006). Detoxification and biotransformational imbalances. *Explore: The Journal of Science and Healing*, 2(2), 122-140.

Little, E. E. (1990). Behavioral toxicology: Stimulating challenges for a growing discipline. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(1), 1-2. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090101>

Little, E. E., Finger, S. E. (1990). Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(1), 13-19. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090103>

Little, E. E., Brewer, S. K. (2001). Neurobehavioral toxicity in fish. En: D. Schlenk y W. H. Benson (eds.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts New Perspectives: Toxicology and the Environment*. Vol. 2. Systems. Taylor and Francis, London y New York, Pp. 139-174.

Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656-666. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1)

Llamazares Vegh, S., Lozano, I. E., Dománico, A. A. (2014). Length–weight, length–length relationships and length at first maturity of fish species from the Paraná and Uruguay rivers, Argentina. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(3), 555-557. <https://doi.org/10.1111/jai.12408>

Lozano, I. E., Llamazares Vegh, S., Gómez, M. I., Piazza, Y. G., Salva, J. L., Fuentes, C. M. (2019). Episodic recruitment of young *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) during high discharge in a floodplain lake of the River Paraná, Argentina. *Fisheries Management and Ecology*, 26(3), 260-268. <https://doi.org/10.1111/fme.12348>

Lozano, I. E., Piazza, Y. G., Babay, P., Sager, E., de la Torre, F. R., Lo Nostro, F. L. (2021). Ivermectin: A multilevel approach to evaluate effects in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes,

1836) (Characiformes, Prochilodontidae), an inland fishery species. *Science of The Total Environment*, 800, 149515. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149515>

Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Husak, V. V., Luzhna, L. I., Lushchak, O. V., Storey, K. B. (2005). Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(8), 1670-1680. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.024>

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

Lushchak, V. I. (2016). Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), 711-747. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>

Lusková, V. r. (1997). Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes. *Acta scientiarum naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae*, Brno. 31(5), 70.

Lynch, T., Price, A. (2007). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American Family Physician* 76(3), 391-396.

Madrid, R. R. M., Mathews, P. D., Patta, A. C. M. F., Gonzales-Flores, A. P., Ramirez, C. A. B., Rigoni, V. L. S., Tavares-Dias, M., Mertins, O. (2021). Safety of oral administration of high doses of ivermectin by means of biocompatible polyelectrolytes formulation. *Heliyon*, 7(1), e05820. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05820>

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. <https://doi.org/10.1139/f85-083>

Maran, E., Fernández, M., Barbieri, P., Font, G., Ruiz, M. J. (2009). Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), 922-930. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.01.018>

Markert, B. (1994). Biomonitoring – *Quo vadis*. *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.* 6 (3), 145–149.

Mazon, A., Monteiro, E., Pinheiro, G., Fernadez, M. (2002). Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology*, 62, 621-631. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400010>

McDonnell, A. M., Dang, C. H. (2013). Basic review of the cytochrome p450 system. Journal of the Advanced Practitioner in Oncology 4(4), 263-268. <https://doi.org/10.6004/jadpro.2013.4.4.7>

McDonnell-Dowling, K., P. Kelly, J. (2017). The Role of Oxidative Stress in Methamphetamine-induced Toxicity and Sources of Variation in the Design of Animal Studies. Current Neuropharmacology 15(2), 300-314. <http://dx.doi.org/10.2174/1570159X14666160428110329>

McIntyre, J. K., Beauchamp, D. A. (2007). Age and trophic position dominate bioaccumulation of mercury and organochlorines in the food web of Lake Washington. Science of The Total Environment, 372(2), 571-584. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.10.035>

McKim, J. M., Christensen, G. M., Hunt, E. P. (1970). Changes in the Blood of Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) After Short-Term and Long-Term Exposure to Copper. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 27(10), 1883-1889. <https://doi.org/10.1139/f70-210>

Mesa, L., Gutiérrez, M. F., Montalto, L., Perez, V., Lifschitz, A. (2020). Concentration and environmental fate of ivermectin in floodplain wetlands: An ecosystem approach. Science of The Total Environment, 706, 135692. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135692>

Metcalfe, C. D., Alder, A. C., Halling-Sørensen, B., Krogh, K., Fenner, K., Larsbo, M., Straub, J. O., Ternes, T. A., Topp, E., Lapen, D. R., Boxall, A. B. A. (2008). Exposure Assessment Methods for Veterinary and Human-Use Medicines in the Environment: PEC vs. MEC Comparisons. En K. Kümmerer (Ed.), Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks (pp. 147-171). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Mladineo, I., Marsic-Lucic, J., Buzancic, M. (2006). Toxicity and gross pathology of ivermectin bath treatment in sea bream *Sparus aurata*, L. Ecotoxicology and Environmental Safety, 63(3), 438-442. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.02.015>

Modesto, K. A., Martinez, C. B. R. (2010). Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere, 81(6), 781-787. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005>

Monserat, J. M., Bianchini, A., Bainy, A. C. D. (2002). Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. Marine Environmental Research, 54(3), 781-785. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00136-8)

Moraes, B. S., Loro, V. L., Pretto, A., da Fonseca, M. B., Menezes, C., Marchesan, E., Reimche, G. B., de Avila, L. A. (2009). Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95(2), 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.06.006>

Mougin, C., Kollmann, A., Dubroca, J., Ducrot, P. H., Alvinerie, M., Galtier, P. (2003). Fate of the veterinary medicine ivermectin in soil. *Environmental Chemistry Letters*, 1(2), 131-134. <https://doi.org/10.1007/s10311-003-0032-9>

Murad, A., Everill, S., Houston, A. (1993). Division of goldfish erythrocytes in circulation. *Canadian Journal of Zoology*, 71(11), 2190-2198. <https://doi.org/10.1139/z93-308>

Nagel, R., Isberner, K. (1998). Testing of chemicals with fish- a critical evaluation of tests with special regard to zebrafish. En: D. E. Braunbeck, D. E. Hinton y B. Streit (Eds.), *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland. 337-342.

Natt, M. P., Herrick, C. A. (1952). A new blood diluent for counting the red and white blood cells of chickens. *Poultry Science*, 31, 335.

Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., Gonzalez, F. J. (2004). Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 23847-23850. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.R400004200>

Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5), 469-484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>

Nilsen, B., M., Berg, K., Goksøyr, A. (1998). Induction of Cytochrome P4501A (CYP1A) in Fish A Biomarker for Environmental Pollution. En I. R. Phillips y E. A. Shephard (Eds.), *Cytochrome P450 Protocols* (pp. 423-438). Totowa, NJ: Humana Press.

Nimmo, I. A. (1987). The glutathione S-transferases of fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 3(4), 163-172. <https://doi.org/10.1007/bf02180277>

Nuntapaitoon, M., Sirisawadi, S., Asawakarn, S., Tummaruk, P. (2019). Accuracy of portable human glucose meter (Accu-chek® Performa) for blood glucose measurement in newborn piglets. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 49(1), 37-42. <https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol49/iss1/5>

Nussey, G., Van Vuren, J. H. J., du Preez, H. H. (1995). Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 111(3), 369-380. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)00063-1](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)00063-1)

Oakes, K. D., Van Der Kraak, G. J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63(4), 447-463. [http://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](http://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)

OECD. (2019). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 203: Acute Toxicity Testing. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

Ogueji, E., Nwani, C., Mbah, C., Iheanacho, S., Nweke, F. (2020). Oxidative stress, biochemical, lipid peroxidation, and antioxidant responses in *Clarias gariepinus* exposed to acute concentrations of ivermectin. *Environmental Science and Pollution Research*. <http://doi.org/10.1007/s11356-019-07035-4>

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

Oliveira, R., Grisolia, C. K., Monteiro, M. S., Soares, A. M. V. M., Domingues, I. (2016). Multilevel assessment of ivermectin effects using different zebrafish life stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 187, 50-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.04.004>

Oliveira, L. C. D., Brasiliense, A. R. P., Dias, M. K. R., Yoshioka, E. T. O., Tavares-Dias, M. (2019). Toxicological, hematological and immunological effects of levamisole and ivermectin diet supplementation on *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae). *Diseases of aquatic organisms*, 136(3), 255-263. <https://doi.org/10.3354/dao03413>

Oppel, J., Broll, G., Löffler, D., Meller, M., Römbke, J., Ternes, T. (2004). Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Science of The Total Environment*, 328(1), 265-273. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.02.004>

Owen, J. B., Butterfield, D. A. (2010). Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. En: P. Bross y N. Gregersen (Eds.), Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and Aging: Concepts and Protocols (pp. 269-277). Totowa, NJ: Humana Press.

Özaslan, M. S., Demir, Y., Aksoy, M., Küfrevioğlu, Ö. I., Beydemir, Ş. (2018). Inhibition effects of pesticides on glutathione-S-transferase enzyme activity of Van Lake fish liver. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 32(9), e22196. <https://doi.org/10.1002/jbt.22196>

Pandey, S., Parvez, S., Ansari, R. A., Ali, M., Kaur, M., Hayat, F., Ahmad, F., Raisuddin, S. (2008). Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. Chemico-Biological Interactions, 174(3), 183-192. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.014>

Passino-Reader, D. R., Berlin, W. H., Hickey, J. P. (1995). Chronic Bioassays of Rainbow Trout Fry with Compounds Representative of Contaminants in Great Lakes Fish. Journal of Great Lakes Research, 21(3), 373-383. [https://doi.org/10.1016/S0380-1330\(95\)71048-6](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(95)71048-6)

Peluso, L., Bulus Rossini, G., Salibián, A., Ronco, A. (2013). Physicochemical and ecotoxicological based assessment of bottom sediments from the Luján River basin, Buenos Aires, Argentina. Environmental Monitoring and Assessment, 185(7), 5993-6002. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-3000-7>

Peluso, L. (2021). Bioensayos de toxicidad. En: P. Carriquiriborde (Ed.). Principios de Ecotoxicología (pp. 268-290), La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; EDULP.

Peng, Z., Jiang, M., Wu, H., He, L., Yang, L. (2012). The pharmacokinetics of ivermectin in *Carassius auratus*. Journal of Fisheries of China, 36(3), 422-428.

Pereira, S., Pinto, A. L., Cortes, R., Fontáinhas-Fernandes, A., Coimbra, A. M., Monteiro, S. M. (2013). Gill histopathological and oxidative stress evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers. Ecotoxicology and Environmental Safety, 90, 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.023>

Piva, F., Ciaprini, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., Regoli, F. (2011). Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. Chemosphere, 83(4), 475-485. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.064>

Post, D. M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83(3), 703-718. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[0703:USITET\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[0703:USITET]2.0.CO;2)

Prasse, C., Löffler, D., Ternes, T. A. (2009). Environmental fate of the anthelmintic ivermectin in an aerobic sediment/water system. *Chemosphere*, 77(10), 1321-1325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.045>

R Core Team. (2020). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria <https://www.R-project.org/>.

Rand, G.M. (2008). Fish Toxicity Studies. En: R. T. Di Giulio y D. E. Hinton (Eds). *The Toxicology of Fishes*. Taylor & Francis Group. NY, Boca Raton, FL, pp. 659-682.

Ranzani-Paiva, M.J.T., de Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I. (2013). Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM.

Rath, S., Pereira, L. A., Bosco, S. M. D., Maniero, M. G., Fostier, A. H., Guimarães, J. R. (2016). Fate of ivermectin in the terrestrial and aquatic environment: mobility, degradation, and toxicity towards *Daphnia similis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(6), 5654-5666. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5787-6>

Rey Vázquez, G. (2012). Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol (Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires).

Rey Vázquez, G., Da Cuña, R. H., Dorelle, L. S., Lo Nostro, F. L. (2020). Immunohistological Biomarkers of Toxicity by a Pharmaceutical Antidepressant in the Freshwater Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 104(2), 180-184. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02770-3>

Roex, E. W. M., Keijzers, R., van Gestel, C. A. M. (2003). Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology*, 64(4), 451-460. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00100-0)

Saglio, P., Trijasse, S. (1998). Behavioral Responses to Atrazine and Diuron in Goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(3), 484-491. <https://doi.org/10.1007/s002449900406>

Sakuma, M. (1998). Probit analysis of preference data. *Applied entomology and zoology*, 33: 339-347. <https://doi.org/10.1303/aez.33.339>

Sancho, E., Cerón, J. J., Ferrando, M. D. (2000). Cholinesterase Activity and Hematological Parameters as Biomarkers of Sublethal Molinate Exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(1), 81-86. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1888>

Santillán Deiú, A., Miglioranza, K. S. B., Ondarza, P. M., de la Torre, F. R. (2021a). Exposure to environmental concentrations of fipronil induces biochemical changes on a neotropical freshwater fish. *Environmental Science and Pollution Research*. doi: 10.1007/s11356-021-13786-w

Santillán Deiú, A., Ondarza, P. M., Miglioranza, K. S. B., de la Torre, F. R. (2021b). Multibiomarker responses and bioaccumulation of fipronil in *Prochilodus lineatus* exposed to spiked sediments: Oxidative stress and antioxidant defenses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 177, 104876. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104876>

Scarcia, P. I. (2013). Biomarcadores de contaminación de teleósteos dulceacuícolas como herramienta de evaluación de ambientes acuáticos afectados por compuestos orgánicos persistentes. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 272 pp.

Scarcia, P., Calamante, G., de la Torre, F. (2014). Responses of biomarkers of a standardized (*Cyprinus carpio*) and a native (*Pimelodella laticeps*) fish species after in situ exposure in a periurban zone of Luján river (Argentina). *Environmental Toxicology*, 29(5), 545-557. <https://doi.org/10.1002/tox.21780>

Schneider, M. J., Barraclough, S. A., Genoway, R. G., Wolford, M. L. (1980). Effects of phenol on predation of juvenile rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 23(2), 121-130. [https://doi.org/10.1016/0143-1471\(80\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0143-1471(80)90060-4)

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebskorn, R. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6(1), 75-86. <https://doi.org/10.1023/A:1008212000208>

Scott, G. R., Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68(4), 369-392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>

Serafini, S., de Freitas Souza, C., Baldissera, M. D., Baldisserotto, B., Picoli, F., Segat, J. C., Baretta, D., da Silva, A. S. (2019). Fish exposed to eprinomectin show hepatic oxidative stress and impairment in enzymes of the phosphotransfer network. *Aquaculture*, 508, 199-205. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.081>

Shaw-Allen, P. L., Romanek, C. S., Bryan, A. L., Brant, H., Jagoe, C. H. (2005). Shifts in Relative Tissue $\delta^{15}\text{N}$ Values in Snowy Egret Nestlings with Dietary Mercury Exposure: A Marker for Increased Protein Degradation. *Environmental Science & Technology*, 39(11), 4226-4233. <https://doi.org/10.1021/es0483950>

Shurbaji, M., Al Rub, M. H. A., Saket, M. M., Qaisi, A. M., Salim, M. L., Abu-Nameh, E. S. M. (2010). Development and Validation of a New HPLC-UV Method for the Simultaneous Determination of Triclabendazole and Ivermectin B1a in a Pharmaceutical Formulation. *Journal of AOAC International*, 93(6), 1868-1873. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.6.1868>

Silva Filho, M. V., Oliveira, M. M., Salles, J. B., Bastos, V. L. F. C., Cassano, V. P. F., Bastos, J. C. (2004). Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases from brain of neotropical fishes. *Toxicology Letters*, 153(2), 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.026>

Slooff, W., Van Kreijl, C. F., Baars, A. J. (1983). Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*, 4(1), 1-14. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(83\)90057-7](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(83)90057-7)

Soivio, A., Oikari, A. (1976). Haematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius* L. *Journal of Fish Biology*, 8(5), 397-411. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1976.tb03968.x>

Stara, A., Kristan, J., Zuskova, E., Velisek, J. (2013). Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(1), 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.11.002>

Stevens, J. T., Breckenridge, C. B. (2001). Crop protection chemicals. Principles and methods of toxicology, 583-591.

Stoliar, O. B., Lushchak, V. I. (2012). Environmental pollution and oxidative stress in fish. *Oxidative stress-environmental induction and dietary antioxidants*, 131-166.

Sullivan, J. F., Atchison, G. J., Kolar, D. J., McIntosh, A. W. (1978). Changes in the Predator–Prey Behavior of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*) and Largemouth Bass

(*Micropterus salmoides*) Caused by Cadmium. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 35(4), 446-451. <https://doi.org/10.1139/f78-077>

Teh, S. J., Adams, S. M., Hinton, D. E. (1997). Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. Aquatic Toxicology, 37(1), 51-70. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00808-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00808-9)

Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., Jaritkhuan, S. (2003). Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Pollution, 121(3), 307-320. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00270-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00270-1)

Tolls, J. (2001). Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. Environmental Science & Technology, 35(17), 3397-3406. <https://doi.org/10.1021/es0003021>

Triebkorn, R., Köhler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S. M., Müller, E. F. (1997). Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, 6(1), 57-73. <https://doi.org/10.1023/A:1008224301117>

Ucán-Marín, F., Ernst, W., O'Dor, R. K., Sherry, J. (2012). Effects of food borne ivermectin on juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Survival, growth, behavior, and physiology. Aquaculture, 334–337, 169-175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.036>

Umar, A. M., Aisami, A. (2020). Acetylcholinesterase Enzyme (AChE) as a Biosensor and Biomarker for Pesticides: A Mini Review. Bulletin of Environmental Science and Sustainable Management (e-ISSN 2716-5353), 4(1), 7-12. <https://doi.org/10.54987/bessm.v4i1.526>

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13(2), 57-149. doi: [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39(1), 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

Vamosi, S. M., Schluter, D. (2002). Impacts of trout predation on fitness of sympatric sticklebacks and their hybrids. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1494), 923-930. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1946>

Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Sudova, E. (2009). Effects of Acute Exposure to Metribuzin on Some Hematological, Biochemical and Histopathological Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(4), 492-495. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9648-1>

Vinagre, T. M., Alciati, J. C., Regoli, F., Bocchetti, R., Yunes, J. S., Bianchini, A., Monserrat, J. M. (2003). Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(1), 67-75. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00076-0](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00076-0)

Vosylienė, M. Z. (1996a). The effect of long-term exposure to copper on physiological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. 2. Studies of hematological parameters. *Ekologija*, 1, 3-6.

Vosylienė, M. Z. (1996b). Haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during short-term exposure to copper. *Ekologija/Ehkologiya/Ecology*, 3, 12-18.

Vosylienė, M. Z. (1999). The Effect of Heavy Metals on Haematological Indices of Fish (Survey). *Acta Zoologica Lituanica*, 9(2), 76-82. <https://doi.org/10.1080/13921657.1999.10512290>

Vosylienė, M. Z., Kazlauskienė, N. (1999). Alterations in Fish Health State Parameters after Exposure to Different Stressors. *Acta Zoologica Lituanica*, 9(2), 83-94. <https://doi.org/10.1080/13921657.1999.10512291>

Wedemeyer, G. A., Gould, R. W., Yasutake, W. T. (1983). Some potentials and limits of the leucocrit test as a fish health assessment method. *Journal of Fish Biology*, 23(6), 711-716. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1983.tb02948.x>

Weis, J. S., Weis, P. (1995). Swimming performance and predator avoidance by mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae after embryonic or larval exposure to methylmercury. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(10), 2168-2173. <https://doi.org/10.1139/f95-809>

Weis, J. S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C., Weis, P. (2001). Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. *BioScience*, 51(3), 209-217. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0209:eocobb\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0209:eocobb]2.0.co;2)

Weis, J. S., Candelmo, A. (2012). Pollutants and fish predator/prey behavior: A review of laboratory and field approaches. *Current Zoology*, 58(1), 9-20. <https://doi.org/10.1093/czoolo/58.1.9>

Weis, J. S. (2013). *Physiological, Developmental and Behavioral Effects of Marine Pollution*. New York: Springer.

Wester, P. W., Canton, J. H. (1991). The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(1), 115-117. [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90135-G](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(91)90135-G)

Williams, R. T. (1963). Detoxication mechanisms in man. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 4(2), 234-254. <https://doi.org/10.1002/cpt196342234>

Witeska, M. (2005). Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic journal of ichthyology*, 1(1), 35-41.

Zala, S. M., Penn, D. J. (2004). Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. *Animal Behaviour*, 68(4), 649-664. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.01.005>

Zhiteneva, L. D., Poltavceva, T. G., Rudnickaja, O. A. (1989). Atlas of normal and pathological cells in the blood of fish. Rostou-on Don, Rio de Janeiro, Brazil, 112.

Zhou, T., Weis, J. S. (1998). Swimming behavior and predator avoidance in three populations of *Fundulus heteroclitus* larvae after embryonic and/or larval exposure to methylmercury. *Aquatic Toxicology*, 43(2), 131-148. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00052-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00052-6)

Zhou, T., Weis, J. S. (1999). Predator avoidance in mummichog larvae from a polluted habitat. *Journal of Fish Biology*, 54(1), 44-57. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00611.x>

Capítulo 3:

**Efectos de la
ivermectina en la
población de sábalo**

Introducción

Modelos poblaciones en biología pesquera

Los modelos de evaluación pesquera son análisis demográficos diseñados para establecer los efectos de la pesquería en las poblaciones de peces y poder evaluar las consecuencias potenciales de políticas alternativas de administración del recurso (Methot y Wetzel, 2013). En pesquerías continentales neotropicales, la aplicación de estos enfoques ha sido escasa o nula. La necesidad de un manejo apropiado se vuelve evidente con el incremento de la pesca comercial, agravado por un escenario de limitada información técnica sobre la evaluación.

Los métodos de evaluación de stock pesqueros que están basados en datos de captura por edad constituyen una de las principales herramientas para la evaluación y el diagnóstico del estado de stocks sujetos a explotación (Peltonen et al., 1999). Estos métodos incluyen al análisis virtual de poblaciones (VPA por las siglas en inglés *Virtual Population Analysis*) (Gulland, 1965, 1983). VPA calcula la abundancia del stock basado en capturas numéricas de cada grupo de edad a lo largo de los años. Puede ser aplicado a stocks pesqueros altamente explotados. La información proveniente del VPA acerca de tendencias en el stock o variabilidad de las clases anuales, permite a los administradores una mejor capacidad al momento de modelar el estado previsto de los stocks en el futuro (Sparre y Venema, 1998) y establecer regulaciones adecuadas. Este enfoque es de especial importancia en especies con un reclutamiento inconsistente o episódico (Scarnecchia et al., 2014).

El sábalo en las pesquerías argentinas

Como ya se mencionara, el sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), es un pez caraciforme iliófago endémico de las cuencas de los ríos Paraná y Paraguay. De acuerdo con Sverlij et al. (1993), *P. lineatus* representa alrededor del 40%, 86% y 95% del total de capturas comerciales en los ríos Paraná, Río de la Plata y Uruguay respectivamente. Esta especie representa hasta el 60% de la biomasa de peces en las lagunas de la planicie de inundación de la baja cuenca del Río de la Plata (Bonetto et al., 1970, 1975, 1994; Tablado et al., 1988) y es la principal especie blanco de las pesquerías en la región (Quirós y Cuch, 1989; Baigún et al., 2008). Desde el punto de vista reproductivo, esta especie posee reclutamientos episódicos, evidenciados por la presencia de cohortes predominantes en las capturas (Espinach Ros et al, 2008; Lozano et al., 2019).

La información existente concerniente a la comercialización del sábalo se remonta al año 1925. Las capturas de sábalo, reflejadas por los volúmenes de exportación (Figura 70),

mostraron un fuerte incremento a partir de fines de la década del 90 con un máximo en 2004 de 32.000 toneladas (t) de sábalo eviscerado, correspondientes a 36.000 t de pescado entero en el año 2004. En el marco de las medidas restrictivas de la exportación aplicadas desde fines de 2006, las exportaciones fueron de 27.505 t en ese año, 17.491 t en 2007, 10.026 t en 2008, y, con excepción de 2019, se mantuvieron sin superar las 20000 t de acuerdo con las certificaciones de SENASA y los registros de Aduana.

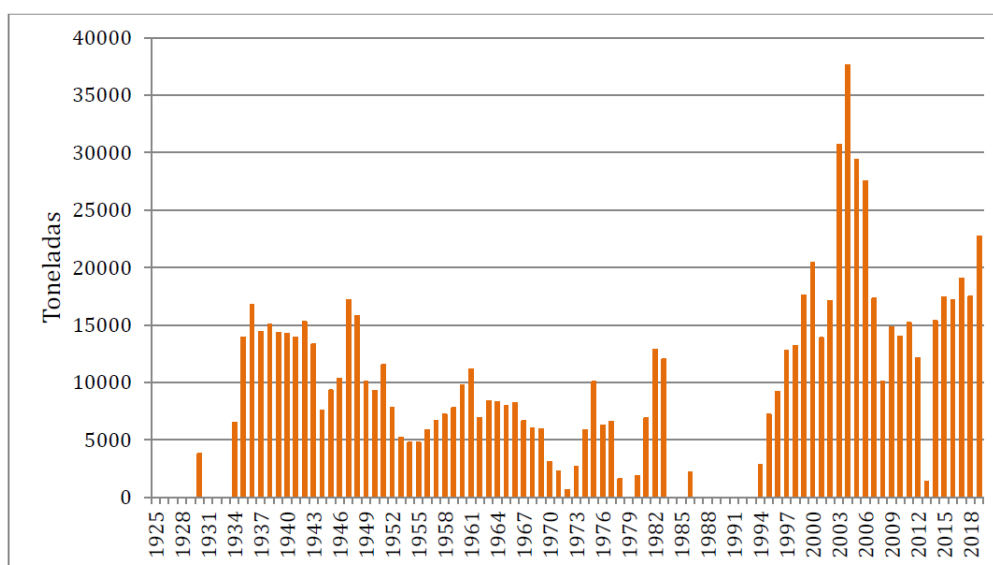


Figura 70- Capturas de sábalo en toneladas entre 1925 y 2019. No hay información disponible entre 1988 y 1993, los datos a partir de 1994 corresponden solamente a las capturas para exportación. (Fuente: Balboni y Mantinian, 2021; SENASA y Administración Nacional de Aduanas).

El impacto de los contaminantes en la dinámica poblacional

Cuando se liberan contaminantes en los ambientes acuáticos, es posible que se produzcan efectos directos (tóxicos) en la biota acuática. Los efectos directos varían con la intensidad y la duración de la exposición a un tóxico, y se estudian con frecuencia, en parte, porque los criterios predictivos para estimar el riesgo y establecer los niveles permisibles de contaminación se basan en las respuestas de las especies a los contaminantes (Long et al., 1995). Estos criterios se derivan de pruebas de toxicidad de laboratorio que generalmente emplean especies modelo en exposiciones a un solo tóxico. Los efectos directos de las sustancias tóxicas suelen reducir la abundancia de los organismos (por el aumento de la mortalidad o la reducción de la fecundidad). La biota de un hábitat dado a menudo muestra una amplia gama de tolerancia a sustancias tóxicas específicas (por ejemplo, los insecticidas y los herbicidas se dirigen a organismos específicos en una comunidad que interactúa) con la consecuencia de que una sustancia tóxica puede ejercer efectos letales en algunas especies, pero no causar efectos observables en otras. Efectos subletales directos, por ejemplo, cambios en el comportamiento o estrés fisiológico, también son posibles (Fleege et al., 2003).

En efecto, como se ha visto en el capítulo anterior, la capacidad de evasión a depredadores de los peces a menudo se altera en respuesta a la exposición a sustancias tóxicas subletales, y la literatura contiene numerosos ejemplos de supervivencia reducida en presas expuestas sujetas a un depredador (Scott y Sloman, 2004).

Es razonable proponer que las alteraciones en los comportamientos normales de evitación de depredadores podrían alterar las relaciones acuáticas depredador-presa en los ecosistemas naturales y, por lo tanto, la estructura de la comunidad, al aumentar la susceptibilidad a la depredación de las poblaciones de peces presa. La capacidad de un pez para evadir el ataque de un depredador está determinada por la coordinación de numerosos parámetros bioquímicos, neurológicos, fisiológicos, morfológicos y de comportamiento (Domenici y Blake 2000), todos parámetros afectables por la presencia de contaminantes. Para algunos productos químicos, la mayor probabilidad de que un depredador pueda atrapar y consumir un pez presa contaminado también aumenta las posibilidades de que la contaminación pase a lo largo de la red trófica (Scott y Sloman, 2004).

Este tipo de respuestas comportamentales a nivel individual pueden, a su vez, tener consecuencias a nivel poblacional al alterar los parámetros demográficos, como las tasas de natalidad, mortalidad y migración (Ford et al., 2021). La interacción entre el comportamiento individual y la dinámica de la población es compleja. En la búsqueda de maximizar la aptitud, los individuos pueden participar en comportamientos que son beneficiosos para ellos mismos pero que son potencialmente perjudiciales para la población (Haldane, 1932). Por el contrario, los cambios en la dinámica de la población también pueden afectar el comportamiento individual, por ejemplo, a través de efectos dependientes de la densidad sobre la búsqueda de alimento, la búsqueda de pareja, agresión y competencia (Kokko y López-Sepulcre, 2007; Robert et al., 2012).

El objetivo del presente capítulo está en línea con el objetivo del eje ambiental de esta tesis a fin de analizar de forma integral el impacto de la IVM sobre la dinámica de reclutamiento de juveniles en las lagunas localizadas en la cuenca baja del Río Paraná. Este capítulo constituye un primer acercamiento a la evaluación de stocks pesqueros de *Prochilodus lineatus* en el bajo río Paraná mediante la aplicación de un modelo de VPA incluyendo los efectos de la IVM a través de biomarcadores comportamentales.

Materiales y métodos

Datos de captura

Los datos de captura de *P. lineatus* fueron obtenidos a partir de las campañas de muestreo del proyecto “Evaluación biológica y pesquera de especies de interés deportivo y

comercial en el Río Paraná. Argentina” (Lozano, 2015) provenientes de cinco localidades diferentes en el río Paraná (Figura 71).

Los datos analizados en esta tesis y plasmados en el informe de Lozano (2015) comprenden el período de análisis 2010-2014, con un total de doce campañas, a razón de dos o tres por año, con un promedio de nueve noches de pesca cada una, distribuidas en las distintas estaciones del año. Los peces fueron capturados utilizando dos baterías de redes agalleras caladas durante el atardecer y viradas la mañana siguiente (12 h aproximadamente). Cada batería de redes consistía en mallas de 12,5 metros de largo de 30, 40, 50, 60, 70, 80 mm de distancia entre nudos estirados; mallas de 25 metros de 90, 105, 120, 140, 160, 180 mm de distancia entre nudos estirados y trasmallos de 25 metros de 105, 120, 140, 160 y 180 mm de distancia entre nudos estirados. Cada pez fue contabilizado, medido, pesado y los otolitos *lapilli* fueron extraídos para la posterior estimación de la edad. En el presente trabajo se asume que este espectro de mallas captura con la misma eficiencia ejemplares del primer año de vida (juveniles y postlarvas) como los de edad máxima.



Figura 71- Localidades de muestreo de sábalo en el río Paraná (Puntos negros).

Modelo de Poblaciones Virtuales (VPA)-Ingreso de datos

Se ha utilizado la captura por unidad de esfuerzo (CPUE) como estimador de abundancia relativa de la población. Se define la CPUE como el número de peces capturados en una noche con la batería de redes utilizada. La CPUE anual promedio fue calculada para cada edad estimada de esta cohorte (Tabla 19).

Para este trabajo solo se ha considerado a la cohorte 2009-2010, cuya edad fue estimada de sus otolitos *lapilli* (Lozano, 2015), por ser la cohorte mayoritaria en las capturas comerciales (más del 90% de las capturas) y de la que se cuenta con información precisa y confiable sobre la edad de los ejemplares dentro del período en que el proyecto fue llevado a cabo.

Tabla 19- Valores de CPUE promedio anual para cada edad obtenida de las campañas de muestreo.

Año	Edad (años)				
	1	2	3	4	5
2010	80.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2011	0.0	40.9	0.0	0.0	0.0
2012	0.0	0.0	60.0	0.0	0.0
2013	0.0	0.0	0.0	29.2	0.0
2014	0.0	0.0	0.0	0.0	30.2

Los datos de CPUE fueron considerados como datos de captura por edad en el modelo de VPA.

El segundo input de datos para el VPA es la mortalidad natural (M). Este parámetro fue estimado siguiendo a Sparre y Venema (1998) y Cadima (2003) con la siguiente fórmula:

$$M \approx \frac{3}{t_{\max}} \quad (1)$$

Donde $t_{\max}$ es la mayor edad observada en el stock o la mayor edad registrada en la literatura para la especie de interés. El $t_{\max}$ para *P. lineatus* a partir de la información disponible en la literatura es de 26 años (Espinach Ros et al., 2008). Por lo tanto, el valor de M utilizado en este trabajo fue ≈ 0.12 .

El tercer *input* de datos fue la “estimación inicial” acerca de la abundancia de los sobrevivientes de mayor edad. Este dato fue obtenido calculando la tasa de decrecimiento en la abundancia de una cohorte a través de los años (asumiendo que todas las clases anuales poseen la misma mortalidad a lo largo del tiempo). La fórmula utilizada fue:

$$Ln \left[\frac{\left(\sum_{a=k}^{a=\infty-1} C_t \right)}{\left(\sum_{a=k+1}^{a=\infty} C_{t+1} \right)} \right] = Z_t \quad (2)$$

Donde Z_t es la tasa de mortalidad de la clase anual y C_t las capturas de una dada clase anual. El valor de Z se obtuvo gráficamente a través de una regresión lineal de los logaritmos naturales de la captura vs la edad.

Con todos los *input* de datos para el VPA estimados, la abundancia (N) fue obtenida con la ecuación de proceso:

$$N_{a,t} = N_{a+1,t+1} e^M + C_t e^{M/2} \quad (3)$$

Donde $N_{a,t}$ es la abundancia para la edad “a” en el año “t”, C_t es el valor de captura en el año “t” y M la mortalidad natural.

Y la abundancia de los ejemplares de mayor edad fue calculada con:

$$N_{t,a} = \frac{C_{t,a} Z_{t,a}}{F_{t,a} (1 - e^{-Z_{t,a}})} \quad (4)$$

Donde $C_{t,a}$ son las capturas en el año “t” para la edad “a”, $Z_{t,a}$ la mortalidad total en el año “t” para la edad “a” y $F_{t,a}$ es la mortalidad por pesca en el año “t” para la edad “a”.

La matriz de mortalidad por pesca (F) fue construida a partir de la matriz de N con la siguiente fórmula:

$$F_{t,a} = Ln \left(\frac{N_{t,a}}{N_{t+1,a+1}} \right) - M \quad (5)$$

Donde $F_{t,a}$ es la mortalidad por pesca de la edad “a” en el año “t”.

Inclusión de biomarcadores comportamentales en el VPA

De todos los biomarcadores comportamentales, se seleccionó la velocidad de escape (VMN) por su vínculo directo con la tasa de mortalidad natural M (ecuación 1). Este parámetro surge a partir de la velocidad máxima de escape frente a un estímulo visual que emula el ataque de un depredador. Un comportamiento de escape alterado implica un menor rendimiento en la natación y, como consecuencia, un aumento en el riesgo de depredación (Jørgensen y Holt, 2013).

Se consideró que los efectos de la caída en la velocidad de escape por la exposición a IVM se dan únicamente en el estadio juvenil, por lo que la M corregida será aplicada en el primer año de vida de la cohorte evaluada. Se considerará también el mayor efecto observado en la caída de la velocidad (caída de un 36,5% frente al control, ver capítulo 2 para efectos de la IVM en velocidad de escape a depredadores) y su potencial impacto en M (el peor escenario posible).

La mortalidad natural tiene dos componentes principales: trófico y depredación (Vetter, 1988). En este análisis se consideró, de manera conservadora, que ambos factores aportan un 50% del valor de M. La corrección de M por los efectos de la IVM fue aplicada en la componente de depredación. Para la corrección de la componente de depredación del parámetro poblacional M se utilizó la caída máxima registrada en la velocidad de escape en los bioensayos de exposición a IVM relativizada al tratamiento control. De esta manera una caída de 30% con respecto al control aumenta un 30% la tasa de depredación (parámetro que representa en este modelo un 50% de M).

La población de sábalo fue evaluada en dos situaciones: juveniles sin exposición a IVM (sin efecto en M en el primer año) y juveniles con exposición a IVM (con efecto en M en el primer año).

Resultados

Estimación inicial de los parámetros

La estimación de Z para la cohorte predominante fue obtenida gráficamente (Figura 72) y fue de $Z \approx 0,2284$. El primer año no fue eliminado del pool de datos de la regresión debido a que la metodología de muestreo puede capturar eficientemente los peces más jóvenes.

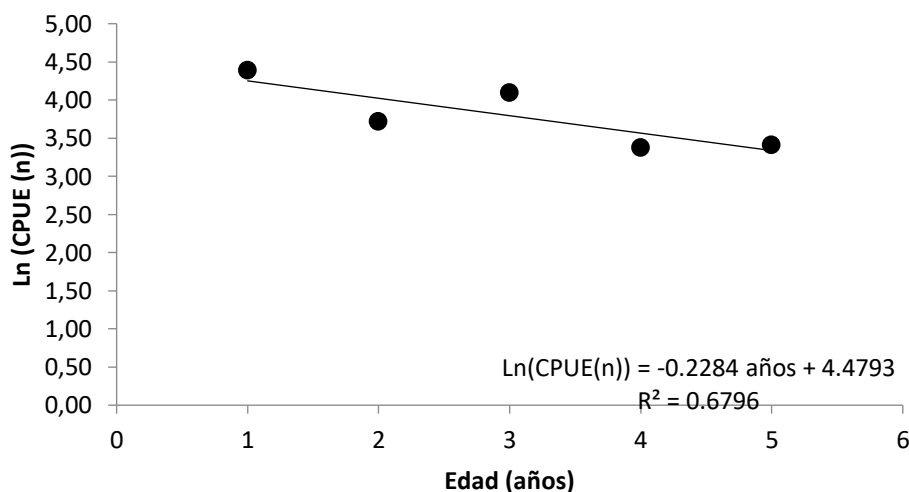


Figura 72- Regresión lineal de los Ln de la CPUE vs la edad de los ejemplares. En el extremo inferior derecho del gráfico se presentan los resultados de la ecuación de ajuste.

La estimación inicial acerca de la abundancia (N) de los sobrevivientes de mayor edad fue llevada a cabo con la estimación de F de los peces de mayor edad. El valor de Z de 0,2284 con un valor de M de 0,12 resulta en un valor de F de 0,1084 para los peces de 5 años de edad.

Con la primera estimación de F , la abundancia de los peces de mayor edad fue calculado de la ecuación (4) resultando en una abundancia de 312 N (CPUE en 2014).

Aplicación del VPA

La estimación de la abundancia a lo largo de los años para la cohorte mayoritaria se muestra en la figura 73. La caída de la abundancia estimada con la CPUE desde 2010 es visible y clara.

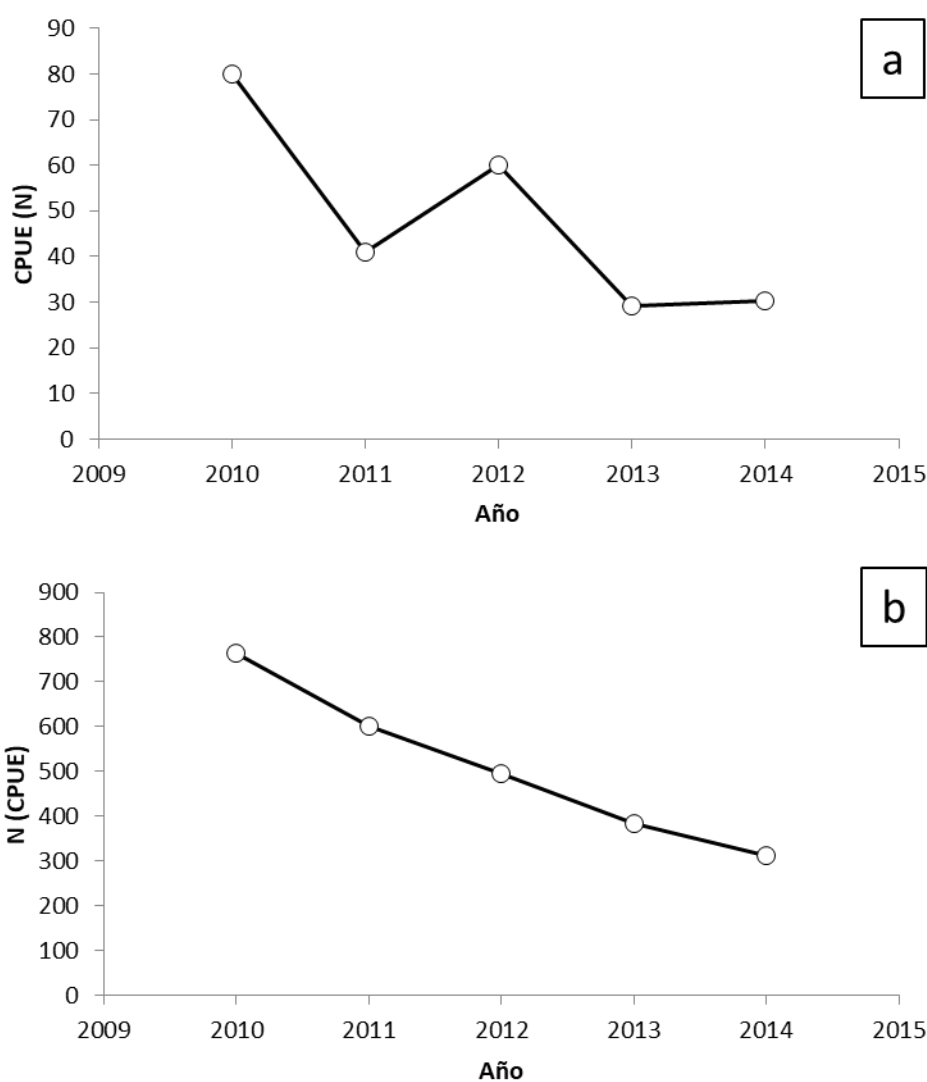


Figura 73- Abundancia de la cohorte 2009-2010 en las capturas a lo largo de los años (a) y población modelada con el VPA (b).

Modelado de la población con y sin efectos de la ivermectina

Considerando los efectos de la IVM en la M solo en el primer año de vida, la abundancia inicial de la cohorte (CPUE=763,5) cae aproximadamente un 5% (CPUE=732,6). En la figura 74 se muestran las curvas de abundancia generadas por el VPA sin considerar y considerando los efectos de la IVM en la M. Además, se muestran las proyecciones de las estimaciones del VPA 5 años hacia adelante (predicción) y 1 año hacia atrás (estimación de la abundancia inicial de la cohorte).

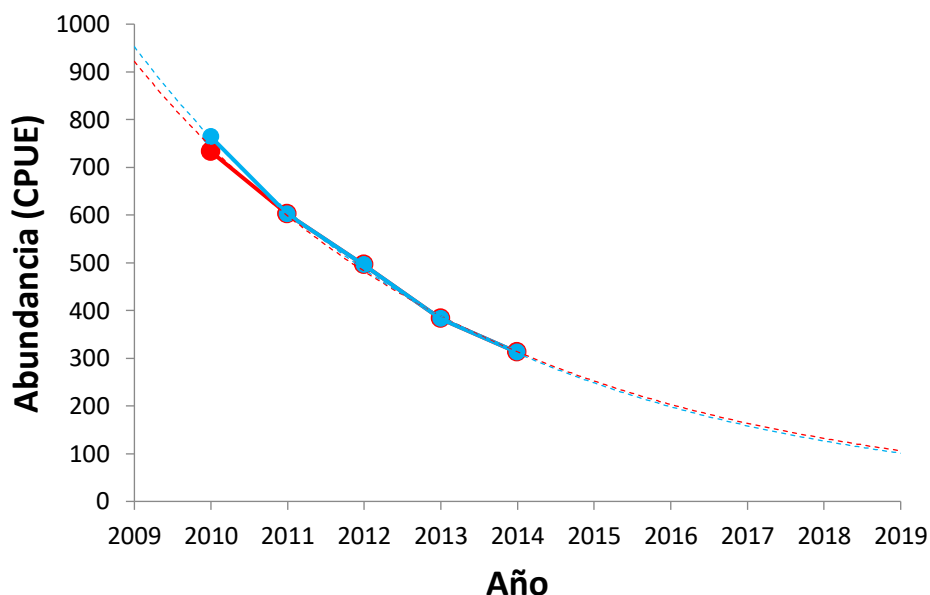


Figura 74- Abundancia estimada (línea continua) y proyecciones (línea punteada) de la cohorte 2009-2010 a través del VPA sin considerar los efectos de la IVM en M (azul) y considerando efectos de IVM en M (rojo).

La variación en la mortalidad por pesca a lo largo de los años se muestra en la figura 75. No se observaron diferencias en la mortalidad por pesca en presencia o ausencia de IVM (con o sin corrección de M).

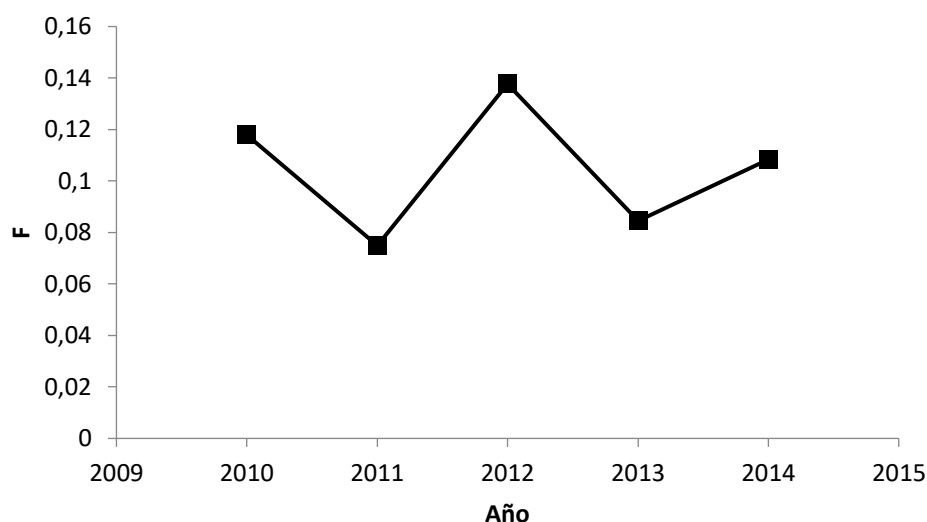


Figure 75- Mortalidad por pesca de *P. lineatus* estimada por el VPA a lo largo de los años analizados.

Discusión

Estado del stock pesquero del sábalo

En el período analizado, la pesquería se enfoca casi en su totalidad en una sola cohorte (Lozano, 2015). La misma presenta un valor de mortalidad por pesca igual al de la mortalidad natural estimada global. La abundancia real de esta cohorte en 2015, en términos de la CPUE, es menor que la mitad de la abundancia en el primer año. En este contexto, la mortalidad por pesca de la población de sábalos en la cuenca baja del río Paraná no estaría mostrando una disminución relacionada con la disminución de la abundancia.

El valor calculado empíricamente de Z fue $\approx 0,23$. Este valor es bajo comparado con los reportados en otras especies del mismo género explotadas comercialmente en pesquerías neotropicales. Estimaciones previas de la mortalidad total para *Prochilodus nigricans* en el Amazonas central fueron de $Z = 1,51$ (Ruffino e Issac, 1995) y $Z = 0,838$ para esta misma especie en el Noreste de Ecuador (Silva y Stewart, 2006); $Z = 1,51$ para *P. magdalenae* en Colombia (Valderrama et al., 1993) y $Z = 1,47$ para *P. platensis* en Bolivia (Payne y Harvey, 1989). Una comparación preliminar de los valores de mortalidad obtenidos en el presente trabajo con la literatura disponible sugeriría que la explotación de *P. lineatus*, durante el período evaluado en el bajo Paraná, no estaría comprometiendo la integridad y la abundancia de la población.

Incertezas y fuentes de variabilidad en el modelado

Las grandes diferencias observadas en los valores de Z de *P. lineatus* con las otras especies de prochilodontidae en Sudamérica pueden ser consecuencia de las metodologías de estimación de edad. En la mayor parte de los estudios previos, las escamas fueron las estructuras

utilizadas para estimar la edad y las edades máximas reportadas no excedían los 10 años. En comparación con los otolitos, las escamas suelen reportar los niveles más bajos de precisión en la estimación de edades (Erickson, 1983; Libby, 1985; Boxrucker, 1986; Sharp y Bernard, 1988; Welch et al., 1993; Lozano et al., 2014). Las estimaciones precisas de la edad son fundamentales para una gestión pesquera adecuada (Lozano et al., 2014). La determinación adecuada de la edad permite calcular la tasa de crecimiento, la tasa de mortalidad y la productividad (Campana, 2001), parámetros que son insumos de cualquier modelo poblacional. Las diferencias de edad observadas en otros prochilodontidae podrían afectar directamente a la estimación de mortalidad natural y por lo tanto al valor de Z , minimizando cualquier potencial efecto de los contaminantes en estos parámetros poblacionales.

Fiabilidad y precisión del análisis virtual de poblaciones para la estimación de la abundancia de sábalo

La proyección de la abundancia modelada y proyectada hasta 2019 con y sin efectos de la IVM sobre M resulta en una abundancia menor al 10% de la abundancia inicial. Estos resultados son coincidentes con lo reportado por Liotta y Arrieta (2020). En su informe técnico en el marco del proyecto “Evaluación biológica y pesquera de especies de interés deportivo y comercial en el Río Paraná. Argentina”, los autores reportan que la cohorte 2009-2010 representa en el período 2018 a 2019 un 4,5% de las capturas en la cuenca baja del río Paraná. Esto significa que la predicción en cuanto a la abundancia de la cohorte 2009-2010 realizada cinco años antes de la última evaluación en 2020, sólo difirió en un 5,5%. Por lo tanto, la elección del modelo de VPA para las poblaciones explotadas comercialmente de sábalo parece ser el adecuado.

Efectos de la ivermectina en la abundancia de la población

La consideración de los efectos de la IVM sobre la capacidad de escape a depredadores y su potencial impacto en la mortalidad natural mostraron efectos en la abundancia en los primeros años de vida (el primer año y el retrocalculado). Esos efectos parecen desaparecer a lo largo de los años y compensarse.

Sin embargo, es importante considerar que el proceso de reclutamiento de esta especie es marcadamente episódico y la supervivencia de los juveniles es un paso clave para el éxito de la cohorte (Lozano et al., 2019). Al colonizar los ambientes de la planicie de inundación, las larvas y juveniles son expuestos a los mayores niveles de IVM en el ambiente (Mesa et al., 2020), debido principalmente a la cercanía con la actividad ganadera. Por lo tanto, los peces se encuentran expuestos a los mayores niveles de IVM en el ambiente en la etapa clave del ciclo

de vida para el éxito de la cohorte. Es posible incluso que el VPA subestime los efectos que un impacto negativo en la supervivencia de los juveniles del primer año de vida pueda tener en el futuro y el éxito de la cohorte a largo plazo.

Aunque los efectos de la IVM en los ejemplares adultos de la cohorte pueden estar presentes, estos pueden verse diluidos por la mortalidad por pesca y otros factores que actúen sobre la mortalidad total. Sin embargo, la presencia de IVM en adultos de sábalo puede tener implicancias desde el punto de vista de la seguridad alimentaria y la bromatología (European Commission N° 37/2010). En efecto se ha iniciado en nuestro país una red de seguridad alimentaria (RSA-CONICET) de alcance nacional que tiene como objetivo contribuir a la evaluación de riesgo en el ámbito de la seguridad alimentaria, donde este tipo problemáticas están siendo evaluadas. Recientemente Lajmanovich et al. (2023) han reportado la presencia de residuos de herbicidas polares en sábalo del río Salado (Santa Fe). Si bien la evaluación fue sobre plaguicidas, la RSA planifica incluir en la lista de contaminantes a monitorear a la IVM.

Bibliografía

Baigún, C. R. M., Puig, A., Minotti, P. G., Kandus, P., Quintana, R., Vicari, R., Bo, R., Oldani, N. O., Nestler, J. A. (2008). Resource use in the Parana River Delta (Argentina): moving away from an ecohydrological approach? *Ecohydrology & Hydrobiology*, 8(2), 245-262. <https://doi.org/10.2478/v10104-009-0019-7>

Balboni, L., Mantinian, J. E. (2021). El sábalo como recurso pesquero en Argentina: los estudios técnico-científicos que contribuyen a una gestión basada en el conocimiento. Coordinación de Pesca Continental, Dirección de Planificación Pesquera, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, MAGyP. Bs. As., Informe Técnico n° 64, 23 pp. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/pesca_continental/informes/proyecto_ebipes/index.php

Bonetto, A. A., Cordiviola de Yuan, E., Pignalberi, C. (1970). Nuevos datos sobre poblaciones de peces en ambientes permanentes del Paraná Medio. *Physis*, 30: 141-154.

Bonetto, A.A. (1975). Hydrologic regime of Paraná River and its influence on Ecosystems. In: *Coupling of Land and Water System, Ecological studies vol.10* (ed. by A.D. Hasler), pp. 175-197. Springer-Verlag, NewYork , NY, USA.

Bonetto, A.A. (1994). Austral Rivers of South America. In: *Limnology Now: A Paradigm of Planetary Problems* (ed. By R. Margalef), pp. 425-472. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands.

Boxrucker, J. (1986): A comparison of otholith and scale methods of aging white crappie in Oklahoma. *North American Journal of Fisheries Management*, 6, 122–125.

Bradford, M. J. (1991). Effects of ageing errors on recruitment time series estimated from sequential population analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 555–558. <https://doi.org/10.1139/f91-070>

Cadima, E. L. (2003). Fish stock assessment manual. FAO Fish. Tech. Pap. 393, 161 p. FAO, Rome.

Campana, S. E. (2001). Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *Journal of Fish Biology* 59(2): 197-242. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00127.x>

Domenici, P., Blake, R. W. (2000). Biomechanics in behaviour. En: P Domenici y R.W. Blake (Eds.), *Biomechanics in animal behaviour* (pp. 1-17). Garland Science.

Erickson, C. M. (1983). Age Determination of Manitoban Walleyes Using Otoliths, Dorsal Spines, and Scales. *North American Journal of Fisheries Management*, 3(2), 176-181. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1983\)3<176:adomwu>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1983)3<176:adomwu>2.0.co;2)

Espinach Ros, A., Dománico, A., Demonte, L., Campana, M., Trogolo, A., Cordiviola, Rodrigues, E. K., Christiansen, E. (2008). Segundo informe del Proyecto Proyecto Evaluación del Recurso Sábalo (*Prochilodus lineatus*) en el Paraná. Informe de los resultados de la segunda etapa - 2006-2007.

European Commission. (2010). Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal European Union*, 15(2377), 1-72.

Fleeger, J. W., Carman, K. R., Nisbet, R. M. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment*, 317(1), 207-233. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4)

Ford, A. T., Ågerstrand, M., Brooks, B. W., Allen, J., Bertram, M. G., Brodin, T., Dang, Z., Duquesne, S., Sahm, R., Hoffmann, F., Hollert, H., Jacob, S., Klüver, N., Lazorchak, J. M., Ledesma, M., Melvin, S. D., Mohr, S., Padilla, S., Pyle, G. G., Scholz, S., Saaristo, M., Smit, E., Steevens, J. A., van den Berg, S., Kloas, W., Wong, B. B. M., Ziegler, M., Maack, G. (2021). The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection. *Environmental Science & Technology*, 55(9), 5620-5628. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06493>

Gulland, J.A. (1965). Estimation of mortality rates. Annex to the Northeast Arctic Working Group Report. ICES, CM 1965. Doc. no. 3.

Gulland, J.A. (1983). Fish stock assessment. A Manual of Basic Methods. Wiley, Chichester, 223 pp.

Haldane, J. (1932). *The Causes of Evolution*; Harper's's, New York.

Jørgensen, C., Holt, R. E. (2013). Natural mortality: Its ecology, how it shapes fish life histories, and why it may be increased by fishing. *Journal of Sea Research*, 75, 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.04.003>

Kokko, H., López-Sepulcre, A. (2007). The ecogenetic link between demography and evolution: can we bridge the gap between theory and data? *Ecology Letters*, 10(9), 773-782. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01086.x>

Lai, H. L., Gunderson, D. R. (1987). Effects of ageing errors on estimates of growth, mortality and yield per recruit for walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). Fisheries Research 5, 287–302. [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(87\)90048-8](https://doi.org/10.1016/0165-7836(87)90048-8)

Lajmanovich, R. C., Repetti, M. R., Cuzziol Boccioni, A. P., Michlig, M. P., Demonte, L., Attademo, A. M., Peltzer, P. M. (2023). Cocktails of pesticide residues in *Prochilodus lineatus* fish of the Salado River (South America): First record of high concentrations of polar herbicides. Science of The Total Environment, 870, 162019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162019>

Libby, D. A. (1985). A comparison of scale and otolith aging methods for the alewife, *Alosa pseudoharengus*. Fishery Bulletin, 83(4), 696-700.

Liotta, J., Arrieta, P. (2020). Seguimiento de cohortes de sábalo (*Prochilodus lineatus*) en los tramos medio y bajo del río Paraná. Informe bianual 2018-2019. Dirección de Planificación y Gestión de Pesquerías, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Buenos Aires, Informe Técnico nº 56: 26 páginas. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/pesca_continental/informes/proyecto_ebipes/index.php

Long, E. R., Macdonald, D. D., Smith, S. L., Calder, F. D. (1995). Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. Environmental Management, 19(1), 81-97. <https://doi.org/10.1007/BF02472006>

Lozano, I. E., Llamazares Vegh, S., Dománico, A. A., Espinach Ros, A. (2014). Comparison of scale and otolith age readings for trahira, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), from Paraná River, Argentina. Journal of Applied Ichthyology, 30(1), 130-134. <https://doi.org/10.1111/jai.12317>

Lozano, I. (2015). Análisis virtual de poblaciones (VPA): primer acercamiento aplicado a las pesquerías del sábalo *Prochilodus lineatus*. Dirección de Pesca Continental, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, MAGyP. Bs. As. Informe Técnico nº 30: 1-17. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/pesca_continental/informes/proyecto_ebipes/index.php

Lozano, I. E., Llamazares Vegh, S., Gómez, M. I., Piazza, Y. G., Salva, J. L., Fuentes, C. M. (2019). Episodic recruitment of young *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) during high discharge in a floodplain lake of the River Paraná, Argentina. Fisheries Management and Ecology, 26(3), 260-268. <https://doi.org/10.1111/fme.12348>

Mesa, L., Gutiérrez, M. F., Montalto, L., Perez, V., Lifschitz, A. (2020). Concentration and environmental fate of ivermectin in floodplain wetlands: An ecosystem approach. Science of The Total Environment, 706, 135692. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135692>

Methot Jr, R. D., Wetzel, C. R. (2013). Stock synthesis: A biological and statistical framework for fish stock assessment and fishery management. Fisheries Research 142(0): 86-99. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.10.012>

Morison, A. K., Coutin, P. C., Robertson, S. G. (1998). Age determination of black bream, *Acanthopagrus butcheri* (Sparidae), from the Gippsland Lakes of south-eastern Australia indicates slow growth and episodic recruitment. Marine and Freshwater Research 49, 491–498. <https://doi.org/10.1071/MF97237>

Payne, A. I., Harvey, M. J. (1989). An assessment of the *Prochilodus platensis* Holmberg population in the Pilcomayo River fishery, Bolivia using scale-based and computer-assisted methods. *Aquaculture Research* 20(3): 233-248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1989.tb00349.x>

Peltonen, H., Ruuhijärvi, J., Malinen, T., Horppila, J. (1999). Estimation of roach (*Rutilus rutilus* (L.)) and smelt (*Osmerus eperlanus* (L.)) stocks with virtual population analysis, hydroacoustics and gillnet CPUE. *Fisheries Research* 44(1): 25-36. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(99\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(99)00057-0)

Quirós, R., Cuch, S. (1989). The fisheries and limnology of the lower Plata Basin. Paper presented at the Proceedings of the International Large River Symposium. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences, 106, 429-443.

Richards, L. J., Schnute, J. T., Kronlund, A. R., Beamish, R. J. (1992). Statistical models for the analysis of ageing error. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 1801–1815. <https://doi.org/10.1139/f92-200>

Rivard, D., Foy, M. G. (1987). An analysis of errors in catch projections for Canadian Atlantic fish stocks. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44, 967–981. <https://doi.org/10.1139/f87-115>

Robert, K., Garant, D., Pelletier, F. (2012). Keep in touch: Does spatial overlap correlate with contact rate frequency? *The Journal of Wildlife Management*, 76(8), 1670-1675. <https://doi.org/10.1002/jwmg.435>

Ruffino, M.L., Issac, V.J. (1995). Life cycle and biological parameters of several Brazilian Amazon fish. *NAGA, the ICLARM Oct*:41–45.

Scarnecchia, D. L., Lim, Y., Ryckman, L. F., Backes, K. M., Miller, S. E., Gangl, R. S., y Schmitz, B. J. (2014). Virtual Population Analysis, Episodic Recruitment, and Harvest Management of Paddlefish with Applications to Other Acipenseriform Fishes. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 22(1), 16-35. <https://doi.org/10.1080/10641262.2013.830592>

Scott, G. R., Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68(4), 369-392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>

Sharp, D., Bernard, D. R. (1988). Precision of Estimated Ages of Lake Trout from Five Calcified Structures. *North American Journal of Fisheries Management*, 8(3), 367-372. [https://doi.org/10.1577/1548-8675\(1988\)008<0367:POEAOL>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8675(1988)008<0367:POEAOL>2.3.CO;2)

Sparre, P., Venema S. C. (1998). Introduction to tropical fish stock assessment, Part 1: manual. *FAO Fish. Tech. Pap.* 306/1, rev. 2, 407 p. FAO, Rome.

Silva, E., Stewart, D. (2006). Age structure, growth and survival rates of the commercial fish *Prochilodus nigricans* (bocachico) in North-eastern Ecuador. *Environmental Biology of Fishes* 77(1): 63-77. <https://doi.org/10.1007/s10641-006-9055-y>

Sverlij, S. B., Espinach Ros, A.E., Orti, G. (1993). Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847), Food & Agriculture Org.

Tablado, A., Oldani, N., Ulibarrie, L., Pignalberi, C. (1988). Cambios estacionales de la densidad de peces en una laguna del valle aluvial del río Paraná (Argentina). *Revista de Hydrobiología Tropical*, 21(4), 335-348.

Tyler, A. V., Beamish, R. J., McFarlane, G. A. (1989). Implications of age determination errors to yield estimates. In *Effects of Ocean Variability on Recruitment and an Evaluation of Parameters used in Stock Assessment Models* (Beamish, R. J. y McFarlane, G. A., eds), pp. 27–35. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 108.

Valderrama, M., Petreire, M., Zarate-Villareal, M., Vera-Urbe, G. (1993). Parámetros poblacionales (mortalidad, rendimiento máximo sostenible) y estado de explotación del bocachico *Prochilodus magdalenae* (Steindachner, 1878; Prochilodontidae) del bajo río Magdalena (Colombia). *Boletín Científico INPA, Colombia* 1:43–60.

Vetter, E. (1988). Estimation of natural mortality in fish stocks: a review. *Fisheries Bulletin*, 86, 25-43.

Welch, T. J., van den Avyle, M. J., Betsill, R. K., Driebe, E. M. (1993). Precision and Relative Accuracy of Striped Bass Age Estimates from Otoliths, Scales, and Anal Fin Rays and Spines. *North American Journal of Fisheries Management*, 13(3), 616-620. [https://doi.org/10.1577/1548-8675\(1993\)013<0616:paraos>2.3.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8675(1993)013<0616:paraos>2.3.co;2)

Conclusiones generales

A continuación, se detallan los resultados principales y las conclusiones obtenidas para cada uno de los objetivos propuestos inicialmente para el presente trabajo de tesis doctoral.

En el ambiente

Objetivo 1: Cuantificar los niveles de ivermectina presentes en muestras de agua y sedimentos de las lagunas localizadas en la cuenca baja del Río Paraná

Con los datos obtenidos en los muestreos ambientales se pusieron a punto una serie de técnicas de extracción y de cuantificación analítica que permitieron medir los niveles ambientales de la ivermectina. Las metodologías optimizadas para la medición en agua (fracción soluble), sedimentos y material particulado en suspensión fueron la extracción en fase sólida (SPE), QuEChERS en medio ácido y la extracción por sonicación, respectivamente. El material particulado en suspensión presentó niveles cuantificables de ivermectina, cuantificándose un máximo de 298,5 µg/Kg. Este objetivo fue abordado en el capítulo 1.

Objetivo 2: Determinar los niveles de ivermectina presentes en ejemplares juveniles provenientes de las lagunas en estudio

Se detectó el compuesto en músculo de juveniles provenientes de las lagunas de la planicie de inundación del Paraná próximas a áreas de cría de ganado. La técnica optimizada y utilizada para la detección de ivermectina en tejido muscular de sábalo fue la de QuEChERS en medio ácido, estableciéndose un límite de detección de 0,2 ppb y 0,5 ppb para la cuantificación. Este objetivo fue desarrollado en el capítulo 1.

Objetivo 3: Estimar el impacto de la IVM sobre la dinámica de reclutamiento de juveniles en las lagunas localizadas en la cuenca baja del Río Paraná

Los modelos poblaciones escogidos pudieron ser aplicados sobre una población de sábalo sometida a presión pesquera. Se escogió un marcador comportamental como modificador directo de la mortalidad natural en el análisis virtual de poblaciones. Los efectos en la velocidad de escape provocados por la ivermectina y cuantificados en el laboratorio mostraron impacto en la población modelada. De la aplicación del modelo y

la modulación indirecta se concluye que la abundancia de sábalos podría verse afectada ante concentraciones ambientales y subletales de ivermectina. Este objetivo fue desarrollado en el capítulo 3.

En el laboratorio

Objetivo 4: Establecer el valor de toxicidad letal aguda de la ivermectina (principio activo) en postlarvas de sábalo

La evaluación de la toxicidad letal aguda (48 h) del principio activo ivermectina en postlarvas (primera etapa de juveniles) de sábalo fue establecida en 1,75 µg/L, ubicando al sábalo entre las especies de peces más sensibles a esta sustancia. Este objetivo fue desarrollado en el capítulo 2.

Objetivo 5: Evaluar los efectos de la exposición subcrónica a IVM (principio activo) tanto en agua como en sedimentos sobre parámetros asociados a estrés oxidativo en ejemplares juveniles

Se estudió una batería de biomarcadores bioquímicos en encéfalo, branquias e hígado. Los efectos pudieron cuantificarse en escenarios de exposición diferentes, en aguas y sedimentos y con diferentes tiempos de exposición (15 y 30 días). El hígado y las branquias, seguido por el encéfalo, presentaron alteraciones significativas. En cuanto al tiempo de exposición, los mayores efectos se observaron a los 15 días. Al incluir la vía trófica como vía de ingreso adicional de la IVM, el diseño de exposición a sedimentos fortificados reportó los mayores efectos. Este objetivo fue desarrollado en el capítulo 2.

Objetivo 6: Determinar las alteraciones producidas por la exposición a IVM a nivel hematológico, inmunológico, neurológico e histológico en juveniles

Se evidenciaron anomalías de origen circulatorio en los peces expuestos durante 30 días a la concentración más alta de IVM (1,5 µg/L). En cuanto a la neurotoxicidad se observó una inhibición de la AChE muscular luego de 15 días de exposición a sedimentos fortificados con IVM (20 µg/kg). Este objetivo fue desarrollado en el capítulo 2.

Objetivo 7: Estudiar el efecto de la exposición a IVM sobre el comportamiento de natación, alimentación y evasión en juveniles de sábalo

Se utilizó una batería de marcadores comportamentales. La velocidad máxima de natación frente a un estímulo fue incorporado al modelo poblacional utilizado en el capítulo 3. Este biomarcador resultó una herramienta robusta para la identificación de efectos de exposición subcrónicos y como parámetro a utilizar en modelos poblacionales que consideren a los contaminantes. En las exposiciones de 15 días a IVM, los biomarcadores comportamentales mostraron efectos significativos de manera global, evidenciados en los sucesivos análisis multivariados. Este objetivo fue desarrollado en el capítulo 2.

Análisis de las hipótesis propuestas

“Se detecta ivermectina en los compartimentos ambientales: agua, sedimento y peces de la planicie de inundación de la baja cuenca del río Paraná”.

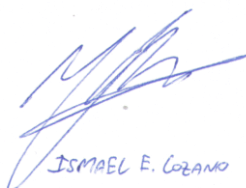
Se confirmó la presencia de ivermectina en el sitio de estudio localizado en lagunas de la planicie de inundación de la baja cuenca del río Paraná. La ivermectina fue detectada en el material particulado en suspensión y en el tejido muscular de juveniles de sábalo.

“La exposición a concentraciones ambientales de ivermectina en juveniles de sábalo produce efectos a nivel bioquímico, fisiológico y en el comportamiento natatorio”.

Se observaron efectos en todos los niveles de organización evaluados: bioquímicos, fisiológicos y comportamentales. Las respuestas de los diferentes biomarcadores variaron en intensidad y relevancia en el impacto general en los distintos escenarios experimentales a los que se expuso a los juveniles de sábalo.

“La presencia de ivermectina en las lagunas de la planicie de inundación de la cuenca del río Paraná afecta la dinámica de reclutamiento del sábalo”.

Se exploró un potencial escenario de impacto de la ivermectina sobre la mortalidad natural y su posterior efecto en la población. En un escenario ambiental con altas concentraciones de ivermectina en las áreas de cría de sábalo en la planicie de inundación del río Paraná, las poblaciones naturales sometidas a presión pesquera pueden verse afectadas. Esta hipótesis aún debe confirmarse con nuevos diseños y modelados.



ISMAEL E. LOZANO



DR. FABIANA LO NOSTRO
CIENCIAS BIOLÓGICAS
FCEN, UBA y CONICET



Dr. Fernando de la Torre

Anexo 1

**Análisis
cromatográficos de la
ivermectina**

Decaimiento de la ivermectina en condiciones experimentales: análisis cromatográficos

Curvas de calibración de solución de Ivermectina en metanol

- Solución madre de ivermectina de 50 ppm (50 mg/L) en metanol.
- La curva de calibración se realizó a partir de una dilución de la solución madre original con los siguientes puntos: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 y 50 ppm. (Figuras A1 y A2)

Curva de estándares para extracto de IVM de agua

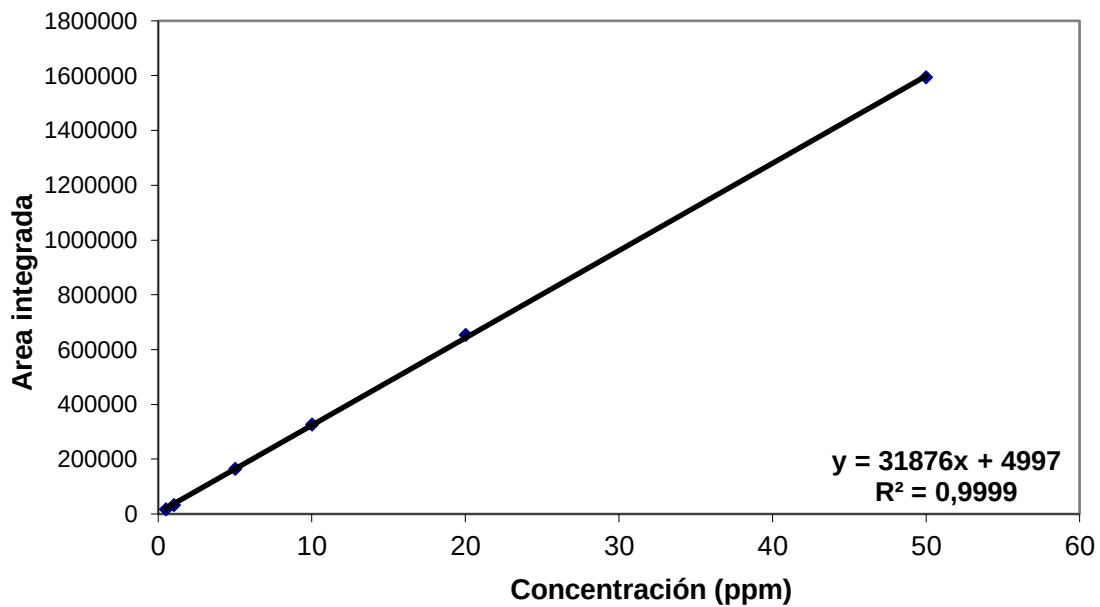


Figura A 1- Curva de calibración con soluciones estándar de ivermectina en metanol.

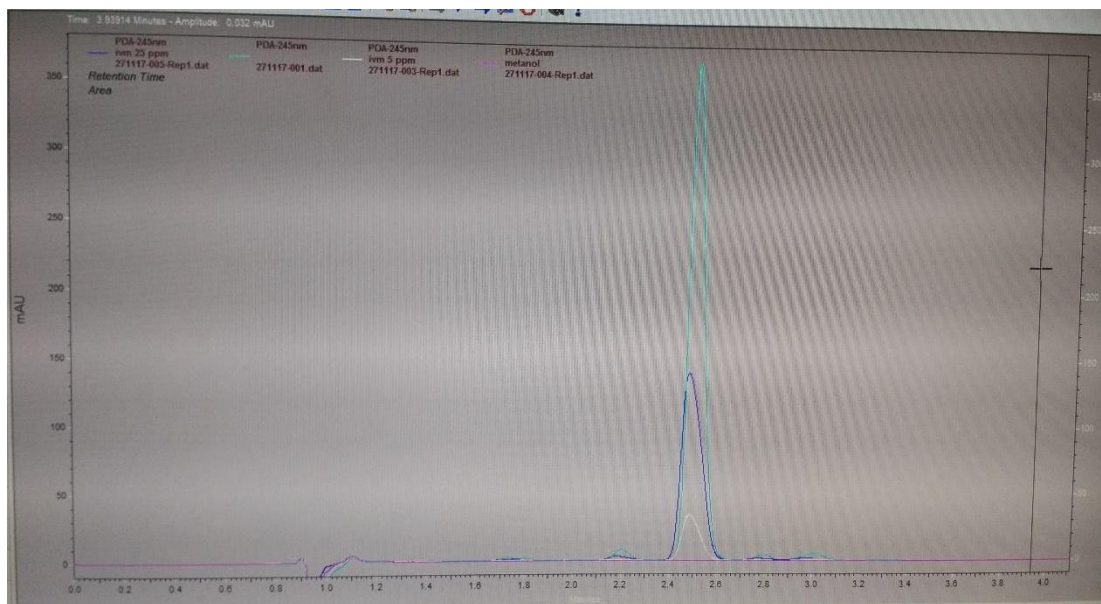


Figura A 2- Cromatograma de las diferentes concentraciones de la curva de calibración.

Calibración del método de extracción de Ivermectina en agua

Se realizaron una serie de diluciones de concentración conocida de la solución madre de IVM en agua milliQ para estimar el rendimiento del método de extracción de IVM en agua (Tabla A1 y Figura A3). El extracto final de IVM se encuentra concentrado unas 50 veces con respecto a la concentración original con el fin de mejorar su detección en las condiciones cromatográficas seleccionadas.

Tabla A 1- Curva de extractos de ivermectina en agua y estimación del rendimiento de extracción.

Extracto	Concentración original (ppm)	Concentración extracto esperada (ppm)	Concentración concentrada obtenida (ppm)	Rendimiento (%)	R	Rendimiento promedio (%)
	0,02	1,0	0,75	4,80	7	74,76
	0,02	1,0	0,75	4,71	7	
	0,1	5,0	3,88	7,65	7	77,76
	0,1	5,0	3,89	7,87	7	
	0,25	12,5	10,20	1,61	8	81,62
	0,25	12,5	10,20	1,63	8	
	0,5	25,0	21,59	6,37	8	86,35
	0,5	25,0	21,58	6,33	8	
	1	50,0	40,70	1,40	8	81,48
	1	50,0	40,78	1,56	8	

Curva de extracción

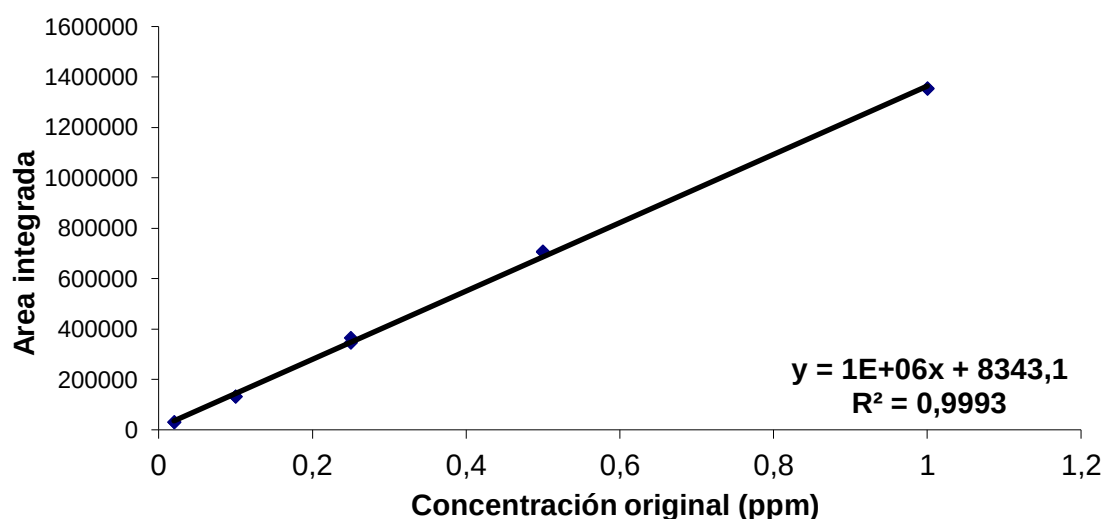


Figura A 3- Curva de calibración de la extracción de ivermectina en agua.

Decaimiento de la ivermectina en acuarios experimentales

Una vez establecido y optimizado el método de extracción de IVM en agua, se dispusieron los acuarios experimentales con las concentraciones de IVM como se explica en el

capítulo 2. Cada día del ensayo se tomaron muestras de 200 ml por duplicado de cada acuario y se estimó la concentración de IVM en esas muestras de agua (Figura A 4).

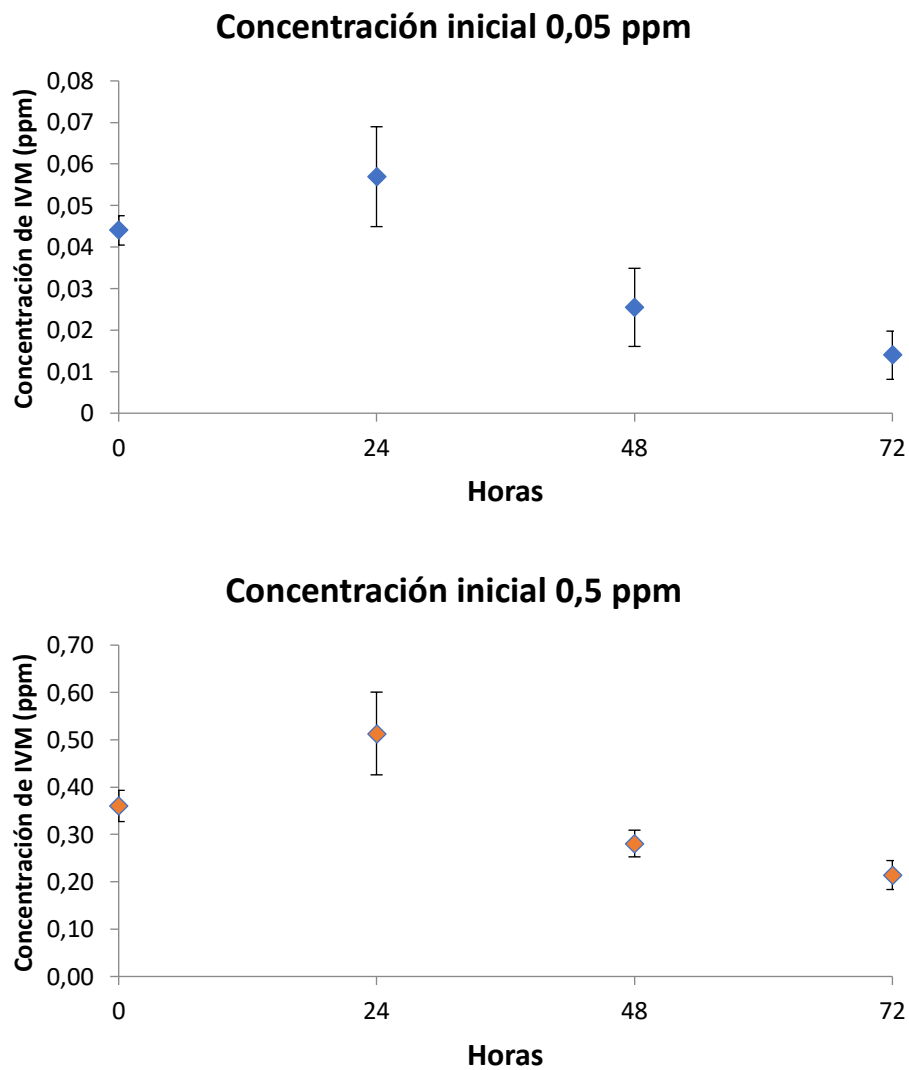


Figura A 4- Decaimiento de la concentración media de ivermectina en agua a lo largo de 72 horas. Las barras de error indican la desviación estándar.

Anexo 2

Técnicas histológicas

Protocolo de histológico de branquias de *Prochilodus lineatus*

Fijación

Inicial

Solución de Bouin por 24 h.

Solución de Bouin: 70 % ácido pícrico, 25 % formaldehído, 5 % ácido acético.

Almacenamiento

Etanol 70%.

Inclusión

Deshidratación e inclusión de las piezas

1. Etanol 80 % – 1 hora
2. Etanol 90 % – 1 hora
3. Etanol 96° – 1 hora
4. Etanol 100 % – 1 hora
5. Xilol – 5´
6. Parafina fundida – 4 horas

Coloración de hematoxilina-eosina

La hematoxilina es un colorante básico y colorea con una coloración violeta los componentes ácidos de una célula como los grupos sulfatos, fosfatos y/o carboxilos ionizados muy presentes principalmente en el núcleo celular. La eosina es un colorante ácido que se asocia a estructuras básicas (catiónicas) del citoplasma y la matriz extracelular, otorgándoles un color rosado.

Desparafinado e hidratación

1. Xilol – 30´
2. Etanol 100 % – 2´
3. Etanol 96° – 2´
4. Etanol 90 % – 2´
5. Etanol 70 % – 2´
6. H₂O dest. – 2´ hasta iniciar coloración

Coloración

1. Hematoxilina de Carazzi – 10´
2. Lavado con H₂O destilada
3. Viraje en agua de red – 5´
4. Lavado con agua destilada
5. Eosina alcohólica – 1´

Deshidratación

1. Etanol 70 % – 2´
2. Etanol 90 % – 2´
3. Etanol 96° – 2´
4. Etanol 100 % – 2´
5. Xilol – 4´

6. Montaje

Coloración tricrómica de Masson modificada

La coloración tricrómica de Masson modificada, es una técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces; también evidencia, aunque en menor intensidad, las fibras reticulares. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular (violeta), el citoplasma (rojo/rosa), fibras de colágeno (azul intenso) y el cartílago (azul tenue).

Desparafinado e hidratación

1. Xilol – 30'
2. Etanol 100 % – 2'
3. Etanol 96° – 2'
4. Etanol 90 % – 2'
5. Etanol 70 % – 2'
6. H₂O destilada. – 2' hasta iniciar coloración

Coloración

1. Hematoxilina de Carazzi – 10'
2. Viraje en agua de red
3. Fucsina Ponceau xilidina – 30''
4. Lavado con H₂O destilada
5. Ácido fosfomolibdico – 5'
6. Azul de anilina acética – 3'
7. Lavado con H₂O destilada

Deshidratación

1. Etanol 70 % – 2'
2. Etanol 90 % – 2'
3. Etanol 96° – 2'
4. Etanol 100 % – 2'
5. Xilol – 4'
6. Montaje

Coloración Azul Alcian

Esta coloración se emplea para detectar glicoconjugados ácidos (tanto glucógeno como mucopolisacáridos; color turquesa) y, en conjunto con la hematoxilina, se distinguen los núcleos (violeta).

Desparafinado e hidratación

1. Xilol – 30'
2. Etanol 100 % – 2'
3. Etanol 96° – 2'
4. Etanol 90 % – 2'
5. Etanol 70 % – 2'
6. H₂O dest. – 2' hasta iniciar coloración

Coloración

1. Azul alcian – 15'
2. Lavado en agua de red
3. Hematoxilina de Carazzi – 10'
4. Viraje en agua de red

Deshidratación

1. Etanol 70 % – 2'
2. Etanol 90 % – 2'
3. Etanol 96° – 2'
4. Etanol 100 % – 2'
5. Xilol – 4'
6. Montaje



ISMAEL E. LOZANO



DR. FABIANA LOZANO
CIENCIAS BIOLÓGICAS
FCEN, UBA y CONICET



Dr. Fernando de la Torre