



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Evaluación de efectos ecofisiológicos y
ecotoxicológicos en *Cnesterodon decemmaculatus*
bajo condiciones de estrés ambiental**

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

Lic. Federico Gastón Baudou

Director de Tesis: Dra. Lucrecia Ferrari.

Consejera de estudios: Dra. Haydée Pizarro.

**Lugar de trabajo: Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA), INEDES-CONICET. Dpto.
de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján.**

Buenos Aires, 26 de marzo de 2019.

Evaluación de efectos ecofisiológicos y ecotoxicológicos en *Cnesterodon decemmaculatus* bajo condiciones de estrés ambiental

Resumen

Las cuencas hídricas bonaerenses están sometidas sistemáticamente a la acción antrópica, siendo el río Reconquista uno de los más contaminados y de los de mayor importancia por su extensión, caudal y recorrido por zonas de gran densidad poblacional. Mediante bioensayos de exposición con las aguas receptoras y el uso de biota preferentemente nativa, acompañado con la caracterización físico-química del agua, es posible estudiar el impacto que puede sufrir un determinado cuerpo de agua de una manera más realista que mediante el uso de especies validadas por los organismos de regulación internacionales, normalmente del hemisferio Norte.

La hipótesis principal es que las aguas de los ríos periurbanos, receptoras de diferentes contaminantes, ejercen efectos adversos sobre la ictiofauna habitante del lugar, siendo *Cnesterodon decemmaculatus* un modelo de evaluación adecuado. *C. decemmaculatus* sufre una alteración en un amplio espectro de parámetros de distinta índole que afectan funciones básicas de los individuos y su *fitness*. El objetivo general es aportar información que contribuya a validar a la especie como organismo modelo para ensayos ecotoxicológicos mediante la caracterización de su respuesta ecofisiológica y ecotoxicológica temprana, integrando aspectos del metabolismo energético, bioquímicos y biométricos. Considerando la posible estacionalidad de algunos de estos biomarcadores, se pretende establecer una línea de base y caracterizar la respuesta al Cadmio, propuesto como tóxico de referencia.

Se realizaron bajo condiciones controladas de laboratorio, cuatro bioensayos semi-estáticos de 12 días de exposición para cada una de las estaciones climáticas (primavera, verano, otoño e invierno), utilizando como medio control negativo agua moderadamente dura -MHW, como control positivo una concentración teórica sub-tóxica de Cadmio -Cd 0.5 mg/l y muestras ambientales provenientes de las nacientes del río Reconquista. Se midió un amplio espectro de biomarcadores de efecto temprano: Biomarcadores biométricos (factor de condición -FC, índice Hepato-somático -IHS, índice Gónado-somático -IGS), Biomarcadores metabólicos (ingesta de alimento -I, producción de heces -H, asimilación del alimento -A, tasa metabólica específica -TME, eficiencia de extracción de oxígeno -EEO, excreción de amonio -E, cociente de amonio -CA y Scope for Growth -SFG) y Biomarcadores bioquímicos (en cerebro, actividad de acetilcolinesterasa -AChE; en hígado, actividad de catalasa -CAT y glutatión-S-transferasa -GST y el contenido de glutatión -GSH).

En las aguas receptoras del río se evaluaron diferentes parámetros físico-químicos, metales pesados y plaguicidas, y se calcularon 2 índices de calidad de agua, los que indicaron contaminación leve o nula del ambiente. En algunas de las muestras ambientales se detectó una elevada concentración de cloruros y mayoritariamente Arsénico y Cobre por encima de los límites permitidos para la protección de la biota acuática. El efecto por exposición al agua del río, generó desórdenes en biomarcadores metabólicos (A, TME, EEO, E, CA y SFG) y bioquímicos (AChE, CAT, GST y GSH) principalmente, que demostraron ser parámetros sensibles para la evaluación de ensayos ecotoxicológicos de efecto temprano.

Además, el efecto por exposición al Cd se pudo observar en la mayoría de los parámetros registrados, resultando ser, bajo las condiciones de ensayo, un buen control positivo para esta especie.

Mediante un análisis de frecuencia se determinaron los biomarcadores con comportamiento estacional, estableciendo una línea de base para animales control en MHW.

Por último, a partir de la elección de las variables biológicas seleccionadas, se efectuó la integración de los mismos mediante índices de respuesta de biomarcadores -IBR y el SFG, que se proponen como índices de *fitness* del animal.

La especie test elegida resultó ser apta para la realización de ensayos de impacto ambiental y se propone como modelo biológico para su validación en bioensayos ecotoxicológicos de efecto temprano en estudios de monitoreo ambiental.

Palabras clave: contaminación; ecotoxicología; río Reconquista; *Cnesterodon decemmaculatus*; campo de crecimiento (*Scope for Growth* -SFG); cadmio; metabolismo; índice de calidad de agua; estrés oxidativo; Índice de Respuesta de Biomarcadores

Evaluation of ecophysiological and ecotoxicological effects in *Cnesterodon decemmaculatus* under environmental stress condition

Abstract

The Buenos Aires river basins are subjected systematically to anthropic action, being the Reconquista river one of the most polluted and one of the most important due to its extension, flow and route through areas of great population density. By means of bioassays of exposure with the receiving waters and using, preferably, native biota, accompanied with the physicochemical characterization of the water, it is possible to study the impact that a certain body of water can suffer in a more realistic way than through the use of species validated by international regulatory agencies, usually from the Northern Hemisphere.

The main hypothesis is that the waters of the periurban rivers, which receive different pollutants, exert adverse effects on the ichthyofauna habitant of the place, being *Cnesterodon decemmaculatus* an adequate evaluation model. *C. decemmaculatus* suffers an alteration in a wide spectrum of parameters of various kinds that affect the basic functions of individuals and their *fitness*. The general objective is to provide information that contributes to validate the species as a model organism for ecotoxicological tests by characterizing its early ecophysiological and ecotoxicological response, integrating aspects of energy metabolism, biochemical and biometric. Considering the possible seasonality of some of these biomarkers, we intend to establish a baseline and characterize the response to Cadmium, proposed as a toxic reference.

Under controlled laboratory conditions, four semi-static bioassays of 12 days of exposure were carried out for each of the climatic seasons (spring, summer, autumn and winter), using moderately hard water as a control medium -MHW, as a positive control theoretical

sub-toxic concentration of Cadmium-Cd 0.5 mg/l and environmental samples from the headwaters of the Reconquista river. A broad spectrum of biomarkers of early effect was measured: Biometric biomarkers (condition factor -CF, hepato-somatic index -HSI, gonad-somatic index -GSI), Metabolic biomarkers (food intake -I, fecal production -F, food assimilation -A, specific metabolic rate -SMR, oxygen extraction efficiency -OEE, ammonium excretion -E, ammonium ratio -CA and Scope for Growth -SFG) and biochemical biomarkers (in brain, acetylcholinesterase activity -AChE; in liver, catalase activity -CAT and glutathione-S-transferase -GST and the content of glutathione -GSH).

In the receiving waters of the river, different physicochemical parameters, heavy metals and pesticides were evaluated, and 2 water quality indexes were calculated, which indicated a slight or no contamination of the environment. In some of the environmental samples, a high concentration of chlorides was detected, and mainly Arsenic and Copper above the permitted limits for the protection of aquatic biota. The effect of exposure to river water, generated disorders in metabolic biomarkers (A, SMR, OEE, E, CA and SFG) and biochemical (AChE, CAT, GST and GSH) mainly, which proved to be sensitive parameters for the evaluation of trials ecotoxicological effects of early effect.

In addition, the effect of exposure to Cd could be observed in most of the registered parameters, resulting, under the test conditions, a good positive control for this species.

Through a frequency analysis, biomarkers with seasonal behavior were determined, establishing a baseline for control animals in MHW.

Finally, choosing the appropriate biological variables, the integration of them was carried out through biomarker response indexes BRI, and SFG, that are proposed as fitness indices of the animal.

The chosen test species was found to be suitable for environmental impact tests and it is proposed as a biological model for its validation in ecotoxicological bioassays of early effect in environmental monitoring studies.

Keywords: pollution; ecotoxicology; Reconquista river; *Cnesterodon decemmaculatus*;
Scope for Growth -SFG; cadmium; metabolism; water quality index; oxidative stress;
Biomarker Response Index -BRI.

Agradecimientos

A la Agencia Nacional de Ciencia y Técnica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET) por el otorgamiento de las becas que me dieron la posibilidad de sostenerme económicamente para dedicarme exclusivamente al desarrollo de esta tesis.

A la excelente y prestigiosa Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA) por haberme formado en mi carrera de doctorado (y de grado).

A la Universidad Nacional de Lujan (UNLu) y al Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA) por haberme brindado el lugar de trabajo y equipamiento necesario para llevar a cabo mi investigación.

Al Departamento de Ciencias Básicas (UNLu) y especialmente al ANPCyT-FONCYT (PICT 2012/1207) por el financiamiento necesario para la realización de esta tesis.

A mi Directora Lucrecia Ferrari. No tengo palabras para referirme a lo que Lucre significa para mí en mi vida. Pero se puede decir que además de directora, fue y es mamá, psicóloga y amiga a la vez. Gracias me queda corto por todo lo que hiciste por mí en estos 5 años de mi vida, trabajando a la par hasta último momento conmigo. Es un honor haber sido dirigido por vos, y me hace sentir especial ser tu último becario. Sos todo un ejemplo para mí.

A Naty, Martu, Betty y Patri del PRODEA (sinónimo del grandísimo Sr Alfredo Salibián). Desde el día uno que llegue al labo, me hicieron sentir como en mi casa. Una calidad humana que resalta por sobre todo. Gracias por todos estos años, chicas. Voy a extrañar las tortas para los cumpleaños/festejos de papers/tesis y los congresos juntos, en particular los *coffee break*. Lo bueno es que nos vamos a seguir viendo!!!

A Belu, Juampi y a todos los pasantes del labo!! Luis, Mili, Mauro, Jesi, Gabi, Fran. No saben lo importantes que son o fueron para el laboratorio, depende mucho de ustedes el

funcionamiento básico. Me encantó poder incluirlos en mis experimentos, pero más en esas charlas complices nuestras. Los voy a extrañar!!

A Fer de la Torre, la ídola de Pao, Ema, Anto y todo GECAP. Tantos almuerzos, congresos y charlas compartidas.

A Marina Tagliaferro por toda la gran mano que me dio. Gracias nena!!

A Fabi Lo Nostro por sus consejos durante la elección de materias y cursos, por brindarme las puertas de su laboratorio. Gracias.

A mi consejera de estudios Haydée Pizarro, por haberme guiado durante todo el doctorado en mis cursos, materias, etc. Muchas gracias!!

Gracias a todas las madrecitas que utilicé, sin ellas esto no hubiera sido posible. Un triunfo mas de la ciencia!

A mi hermano Germán y Vicky por haberme dado durante este tiempo a estos dos hermosos sobrinos que son Amapola y Lisandro, que llegaron a nuestra vida para poblarla de felicidad y alegría. Siempre juntos, Ger. En las buenas y en las malas mucho más. No saben lo que significan ambos para mí. Los amo.

A mi tia Pily, que también me regaló dos primitos hermosos como son Sofy y Tomy. Todo resultado de tu amor y tu esfuerzo, pily. Sos una leona, estoy muy orgulloso de vos.

A mi primo Ari (y obviamente a la genia de Evi), que me acompaña en mi vida desde el jardín de infantes. Tía Roxana (mi mama en vida), tío Jose (un corazón con piernas), Naty, Nani, Camilito. Son el legado de mis padres en vida, y no saben lo importante que son para mí. A Lean, Malen y las hermosas Geme Azul y Mora. A la genia de Susana. A Ampí, Alfredo, Almendrita y al futuro pimpollito. Todos ustedes son mi familia, que me sostiene y acompaña en todo lo que emprendo en la vida. Su apoyo me llena de seguridad en cada uno de mis pasos. Gracias!!!

Gracias también a Amalia, con quien hacemos un equipo increíble que me permite ir dándome cuenta de mis elecciones personales en la vida.

A Jime, Dani, Nahue, Andrew, Euge y Caro por ser mis compañeros fieles desde la facu. Gracias por sus consejos, su amistad, por su amor. Por estar ahí cuando se los necesita, a toda hora donde sea que estén. A Esteban Szames, por tantos años que seguimos viviendo juntos, estemos donde estemos de la manera que sea.

A mis amigos Sebas, Sere, Nico, Glow, Sebas, Gonza, Gas, Ari, etc, mi familia por adopción. Sus risas, su energía, su compañía... por entenderme, por escucharme, por bancarme, por llenarme de amor y buena onda.

A mi tía Carmen, mi maestra espiritual que al día de hoy me sigue acompañando.

Por último, me voy a agradecerme a mi mismo por todo el empeño, esfuerzo y dedicación que le pongo a todo lo que me propongo en la vida. Desde chico que soñaba con ser biólogo, y hoy estoy a punto de ser nada menos que Doctor en biología. Estoy muy orgulloso de mi. Espero que mi contribución en el campo de la ecotoxicología sea de gran ayuda, dejo mi huella en esta difícil rama de estudio para todo aquel que este interesado. Me costó mucho, pero valió la pena.

El equilibrio de mi verdadero ser, es mi mayor protección.

Gracias a todes!!!

Dedicado a la memoria de mis Padres, que día a día me siguen acompañando. Siempre en mi corazón.

Tabla de contenido

Resumen	ii
Abstract	v
Agradecimientos	viii
índice de abreviaturas	xvii
índice de figuras	xviii
índice de tablas	xxi

Sección I

CAPITULO 1	2
Introducción general.....	2
1.1 Contaminación del agua dulce	2
1.2 Ecotoxicología	3
2.1 Cuerpos de agua de la Provincia de Buenos Aires	3
2.2 Los ríos como ecosistemas acuáticos.....	4
2.3 El río Reconquista como modelo de estudio de una cuenca hídrica contaminada	5
2.4 Evaluación de parámetros físico-químicos de las muestras ambientales.....	8
2.5 índices de calidad de agua (ICA)	8
3.1 Evaluación de la contaminación sobre la biota. Bioensayos de toxicidad.....	9
3.2 Uso y utilidad de los tóxicos de referencia.....	11
3.3 El cadmio (Cd) como contaminante y su utilización como tóxico de referencia	12
3.4 Los peces como organismos de experimentación.....	16
3.5 <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> como modelo experimental para bioensayos.....	17
4.1 Biomarcadores de contaminación	19
4.2 Biomarcadores biométricos	21
4.3 Biomarcadores metabólicos.....	21
4.4 Biomarcadores bioquímicos.....	22
4.4.1 De estrés oxidativo	22
4.4.2 De daño en sistema nervioso.....	25
5.1 Consideraciones acerca de la variabilidad de los biomarcadores	27
5.1.1 Valores basales de los biomarcadores (línea de base)	27
5.1.2 Variabilidad estacional de los biomarcadores	27
5.1.3 Evaluación integral de biomarcadores mediante la aplicación de índices	28

CAPITULO 2	30
Hipótesis y objetivos.....	30
1 Hipótesis.....	30
2 Objetivo general	31
3 Objetivos básicos	31
4 Objetivos particulares	31
CAPITULO 3	32
Materiales y métodos.....	32
1 Animales test utilizados en los bioensayos.....	32
2 Diseño experimental	33
2.1 Medios de exposición	33
2.2 Diagrama de ensayo	34
2.2.1 Sub-ensayo de biomarcadores metabólicos	35
2.2.2 Sub-ensayo de biomarcadores bioquímicos e índices biométricos	36
3 Metodología para la obtención y procesamiento del material biológico.....	36
4 Puntos finales/ endpoints.....	37
4.1 Parámetros metabólicos	37
4.1.1 Metabolismo energético	37
4.2 Biomarcadores morfológicos	39
4.2.1 índices biométricos	39
4.3 Biomarcadores bioquímicos (enzimáticos y no enzimáticos)	39
4.3.1 Realización de homogenatos	40
4.3.2 Determinaciones bioquímicas	40
5 Análisis de calidad de agua de las muestras ambientales.....	43
6 índices químicos de la calidad del agua	45
7 Análisis estadístico	45

Sección II

Resultados	47
CAPITULO 4	48
Evaluación de la mortalidad en <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> luego de 12 días de exposición a agua del Rio Reconquista y a Cadmio en concentración subtóxica.....	48
1 INTRODUCCIÓN.....	48
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO	49

3 MATERIALES Y MÉTODOS	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Calidad del agua proveniente de las nacientes del río Reconquista: características físico-químicas de las muestras ambientales	51
4.2 Evaluación de parámetros físico-químicos medidos en las réplicas experimentales:.....	54
4.3 Mortalidad durante los bioensayos a 12 días de exposición	56
5 DISCUSIÓN	58
6 CONCLUSIONES	62
CAPITULO 5	63
Propuesta de líneas de base de biomarcadores en animales control experimental de laboratorio.	63
1 INTRODUCCIÓN.....	63
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO	64
3 MATERIALES Y MÉTODOS	65
4 RESULTADOS.....	66
4.1 Variables Biométricas	66
4.2 Variables del Metabolismo Energético	77
4.3 Variables bioquímicas: Biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos.....	91
5 DISCUSION	99
6 CONCLUSIONES	108
CAPITULO 6	110
Evaluación del efecto de la exposición al cadmio como tóxico de referencia sobreparámetros biométricos, bioenergéticos y bioquímicos en adultos de <i>C. decemmaculatus</i> en laboratorio ..	110
1 INTRODUCCIÓN.....	110
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO	111
3 MATERIALES Y MÉTODOS	112
4 RESULTADOS.....	113
4.1 Variables Biométricas	113
4.2 Variables del Metabolismo Energético	118
4.3 Variables bioquímicas: Biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos.....	124
5 DISCUSION	127
6 CONCLUSIONES	137
CAPITULO 7	140

Evaluación del efecto de la exposición a aguas receptoras del río Reconquista sobre adultos de <i>C. decemmaculatus</i> en laboratorio.....	140
1 INTRODUCCIÓN.....	140
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO	141
3 MATERIALES Y MÉTODOS	142
4 RESULTADOS.....	143
4.1 Variables Biométricas	144
4.2 Variables del Metabolismo Energético	149
4.3 Variables bioquímicas: Biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos.....	154
5 DISCUSION.....	157
6 CONCLUSIONES	167
CAPITULO 8	169
Integración de biomarcadores mediante la aplicación de índices de estado de salud del animal o <i>fitness</i>: aplicación de IBR y el SFG.....	169
1 INTRODUCCIÓN.....	169
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO	170
3 MATERIALES Y MÉTODOS	171
4 RESULTADOS.....	173
4.1 Scope for Growth (SFG)	173
4.2 Índice de respuesta de biomarcadores (IBR) utilizando biomarcadores bioquímicos.....	175
5 DISCUSION.....	180
6 CONCLUSIONES	185
Sección III	
Discusión general y Conclusiones	186
CAPITULO 9	187
Discusión general y conclusiones	187
Discusión	187
Conclusiones.....	194
Protocolo de ensayo de evaluación de efecto temprano de aguas receptoras en laboratorio para ecotoxicidad de aguas receptoras con adultos de <i>C. decemmaculatus</i> como modelo biológico	197
ANEXO CAPITULO 3	199
ANEXO CAPITULO 4	212
ANEXO CAPITULO 5	215

ANEXO CAPITULO 6	231
ANEXO CAPITULO 7	244
ANEXO CAPITULO 8	255
Bibliografía.....	260

Índice de abreviaturas

- A: asimilación específica
- AChE: acetilcolinesterasa
- CA: cociente de amonio
- CAT: catalasa
- Cd: Cadmio
- E: excreción de amonio
- EEO: eficiencia de extracción de oxígeno
- EROs: especies reactivas del oxígeno
- FC: Factor de condición
- GSH: glutatión reducido
- GST: glutatión-S-transferasa
- IBR: *Integrated Biomarker Response*
- ICA: índices de calidad de agua
- ICAB: índice de Beron
- ICAPI: índice de Lacoste & Collasius
- IGS: índice gónado-somático
- H: producción de heces
- I: ingesta de alimento
- IHS: Índice hepato-somático
- OD: oxígeno disuelto
- Prot: proteínas
- TME: tasa metabólica específica
- SFG: *Scope For Growth*

Índice de figuras

- 1.2:** diagrama simplificado de diferentes fuentes de ingreso de contaminantes y su distribución en los ecosistemas acuáticos y bioacumulación en peces.
- 1.3:** localización geográfica de la cuenca del Río Reconquista, el aporte de caudal de los diferentes arroyos y su recorrido hasta la desembocadura en el río Lujan.
- 1.4:** fotografía de la represa Roggero, inicio del cauce principal del río Reconquista.
- 1.5:** representación de los efectos observados en un organismo en respuesta frente a una exposición crónica o aguda de un tóxico.
- 1.6:** esquema general de los efectos tóxicos producidos por el Cd a nivel celular, resumen de su toxicodinámica.
- 1.7:** ejemplares adultos de ambos sexos de la especie modelo, *C. decemmaculatus*.
- 1.8:** distribución de *C. decemmaculatus* solapada con las áreas modificadas por actividades antrópicas.
- 1.9:** representación de la utilización de biomarcadores en bioensayos para ecotoxicología.
- 1.10:** formación de especies reactivas del oxígeno (EROs).
- 1.11:** esquema general de reacciones químicas correspondientes a los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas.
- 1.12:** representación del impulso nervioso entre neuronas de la sinapsis colinérgica.
- 3.1:** sitio de muestreo del agua del río Reconquista utilizada en el experimento.
- 4.1:** mortalidad acumulada (%) luego de 12 días de exposición para cada tratamiento y ensayo para *Cnesterodon decemmaculatus*
- 5.1:** análisis de frecuencia para talla de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno.
- 5.2:** análisis de frecuencia para pesos corporales de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno.
- 5.3:** análisis de frecuencia para Factor de condición (FC) de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno.
- 5.4:** análisis de frecuencia para Índice Hepato-somático (IHS) de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno.
- 5.5:** análisis de frecuencia para peso de ovarios de los grupos control de los bioensayos de verano, otoño e invierno.
- 5.6:** análisis de frecuencia para Índice Gónadosomático (IGS) de controles de los bioensayos de verano, otoño e invierno.
- 5.7:** análisis de frecuencia para Ingesta (I) de controles -MHW de los cuatro ensayos estacionales.

- 5.8:** análisis de frecuencia para producción de heces (H) de controles de los cuatro ensayos estacionales.
- 5.9:** análisis de frecuencia para Asimilación de controles de los cuatro ensayos estacionales.
- 5.10:** análisis de frecuencia para Eficiencia de Extracción de Oxígeno (EEO) de controles de los cuatro ensayos estacionales.
- 5.11:** análisis de frecuencia para la variable TME de controles de los cuatro ensayos estacionales.
- 5.12:** análisis de frecuencia para la variable excreción de amonio (E) de controles de los cuatro ensayos estacionales.
- 5.13:** análisis de frecuencia para la variable CA de controles de los cuatro ensayos estacionales.
- 5.14:** análisis de frecuencia para la variable SFG de controles de los cuatro ensayos estacionales.
- 5.15:** análisis de frecuencia para AChE de controles de los bioensayos de primavera, verano y otoño.
- 5.16:** análisis de frecuencia para CAT de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno.
- 5.17:** análisis de frecuencia para GST de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno.
- 5.18:** análisis de frecuencia para GSH de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno.
- 6.1:** talla, Peso corporal, Factor de Condición (FC), peso del hígado e índice hepato-somático (IHS) de adultos de *C. decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o Cd.
- 6.2:** índice Gónado-somático de hembras (IGS) y peso de ovarios de adultas de *C. decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o Cd como tóxico de referencia.
- 6.3:** ingesta (I), producción de heces (H) y asimilación del alimento (A) en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o medio control positivo utilizando al Cd como tóxico de referencia.
- 6.4:** eficiencia de extracción de oxígeno (EEO%), tasa metabólica específica (TME), Excreción de amonio (E), cociente de amonio (CA) y *Scope For Growth* o campo de crecimiento (SFG) en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o medio control positivo utilizando al Cd como tóxico de referencia.
- 6.5:** actividad de CAT (AE: mmoles H₂O₂ hidr/min/mg), GST (U/mg Pr) y contenido de GSH (μmol/g tejido) en hígado y actividad de AChE (nmol/ming Pr) en cerebro de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o medio control positivo utilizando al Cd como tóxico de referencia.
- 7.1:** talla, Peso corporal, Factor de Condición (FC), peso del hígado e índice hepato-somático (IHS) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control paralelo y el tratamiento intra-ensayo (P<0.05).

- 7.2:** peso de ovarios e índice gónado-somático (IGS) de hembras adultas de *C. decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR.
- 7.3:** ingesta (I), producción de heces (H) y asimilación del alimento (A) (J/g/PH/día) en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional expuestos por 12 días a medio control -MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR. Los asteriscos indican diferencias significativas entre RR vs su control paralelo intra-ensayo ($P < 0.05$).
- 7.4:** tasa metabólica específica (TME), Eficiencia de extracción de oxígeno (EEO%), Excreción de amonio (E), cociente de amonio (CA) y *Scope For Growth* (SFG) en adultos de *C. decemmaculatus* correspondientes a los cuatro ensayos luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control paralelo y el tratamiento intra-ensayo ($P < 0.05$).
- 7.5:** actividad de CAT (AE: mmoles H_2O_2 hidr/min/mg), GST (U/mg Pr), contenido de GSH (μ mol/g tejido) en hígado y actividad de AChE (nmol/ming Pr) en cerebro de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control paralelo y el tratamiento intra-ensayo ($P < 0.05$).
- 8.1:** variabilidad inter-ensayo del SFG calculado en *C. decemmaculatus* de cada tratamiento para cada estación, luego de 12 días de exposición a MHW, Cd o RR. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).
- 8.2:** a-d. Índices de respuesta integrada de los biomarcadores (IBR) obtenidos en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* 12 días de exposición a medio control (MHW), tóxico referente (Cd) y aguas receptoras del río Reconquista (RR). -Prot h: proteínas de hígado, -CAT: actividad de catalasa; -GSH: actividad de glutatión S-transferasa; GST: contenido de glutatión reducido.
- 8.3:** a-c. Índices de respuesta integrada de los biomarcadores utilizados (IBR) se grafican como Stars blots o gráficos estrella evaluados en *Cnesterodon decemmaculatus* 12 días de exposición bajo condiciones controladas de laboratorio. -Prot h: proteínas de hígado, -AChE: actividad de acetil-colin-esterasa; Prot c: proteínas de cerebro; -CAT: actividad de catalasa; -GSH: actividad de glutatión S-transferasa; GST: contenido de glutatión reducido.

Índice de tablas

- 1.1:** algunas características físico químicas del Cadmio metálico y del Cloruro de Cadmio (CdCl₂)
- 4.1:** parámetros físico-químicos e índices de calidad del agua de las muestras del agua superficial del río Reconquista.
- 4.2:** parámetros físico-químicos medidos de los medios de las réplicas durante los bioensayos.
- 4.3:** valores analíticos de Cd medidos cada 48-96 h en todas las réplicas.
- 5.1:** valores estadísticos descriptivos básicos paratalla, Peso corporal, Factor de Condición (FC) e índice hepato-somático (IHS) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW.
- 5.2:** valores estadísticos descriptivos básicos paraíndice Gónado somático de hembras - IGS y peso de ovarios (mg) de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW.
- 5.3:** valores estadísticos descriptivos básicos para la ingesta (I), producción de heces (H) y asimilación específica (A) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW.
- 5.4:** valores estadísticos descriptivos básicos para el total de datos para la Ingesta (I), producción de heces (H) y asimilación específica (A) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a medio control -MHW.
- 5.5:** valores estadísticos descriptivos básicos para la eficiencia de Extracción de Oxígeno (EEO), Tasa Metabólica Específica (TME), Excreción de amonio (E) Cociente de Amonio (CA) y campo de Crecimiento (SFG) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW.
- 5.6:** valores estadísticos descriptivos básicos para la eficiencia de Extracción de Oxígeno (EEO), Tasa Metabólica Específica (TME), Excreción de amonio (E), Cociente de Amonio (CA) y campo de Crecimiento (SFG) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes al total de ensayos luego de 12 días de exposición a medio control -MHW.
- 5.7:** actividad de acetilcolinesterasa cerebral (AChE) en *Cnesterodon decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a medio control -MHW.
- 5.8:** valores estadísticos descriptivos básicos para cada ensayo y para el total de datos de la actividad CAT, GST y contenido de GSH en hígado de *Cnesterodon decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a medio control -MHW.
- 5.9:** resumen de rangos esperables luego de 12 días de permanencia en condiciones de control experimental en MHW de los distintos biomarcadores utilizados.

8.1: valores de SFG (J/g Ph/día) obtenidos luego de 12 días de exposición a MHW, Cd o RR en *C. decemmaculatus* para las cuatro estaciones ensayadas.

Sección I

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.1 Contaminación del agua dulce

El agua dulce es el recurso natural que más peligro corre debido a su escasez y al deterioro de su calidad por la contaminación. A lo largo de la historia las poblaciones humanas se han asentado en las cercanías de los cuerpos de agua dulce y le han dado múltiples aplicaciones, como ser el consumo, la explotación de recursos, el riego, la recreación y como vía de eliminación de todo tipo de desechos. Los cuerpos de agua dulce también son el hábitat de diferentes organismos y sustento de la biota en general, por lo que es un recurso que debe compartirse con todo el ecosistema de manera responsable (Biswas, 2005; UNESCO, 2006; Achiorno, 2010).

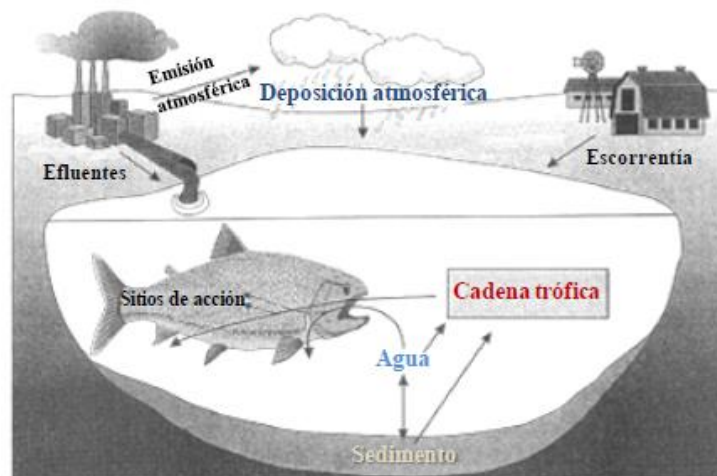


Figura 1.2: Diagrama simplificado de diferentes fuentes de ingreso de contaminantes y su distribución en los ecosistemas acuáticos y bioacumulación en peces (tomado de Scarcia, 2014).

En la actualidad y desde hace ya muchos años, la contaminación de los cuerpos de agua continentales son un problema de gran interés a nivel mundial a causa del daño que

provoca en los diferentes ecosistemas, afectando directa o indirectamente a las especies que los habitan y a las biocenosis que los componen, generando un gran impacto en la calidad de aguas. Los ecosistemas acuáticos se ven perjudicados, en última instancia, a causa de los diferentes tipos de contaminantes (sean de origen natural o antrópico) que se depositan en los cuerpos de agua, e interaccionan de manera diversa, entre sí y con la biota del lugar (Figura 1.2).

1.2 Ecotoxicología

Por definición, la ecotoxicología es el campo de la toxicología que se encarga del estudio del impacto de los diferentes tóxicos sobre el ecosistema (Truhaut, 1977). Es una disciplina científica que estudia los efectos tóxicos de sustancias químicas, físicas o mezclas, ya sean naturales o xenobióticos, sobre la diversidad de organismos, poblaciones y comunidades en los ecosistemas. Forbes y Forbes (1994) la definieron como el área de estudio científico que integra los efectos ecológicos y toxicológicos de químicos sobre los ecosistemas considerando el transporte, la transformación y la descomposición de estos en el medio ambiente.

En síntesis, se la puede definir como la ciencia que se encarga del estudio de los diversos contaminantes en la biósfera y los posibles efectos que estos pueden causar sobre los constituyentes de la misma, incluyendo a los seres humanos (Newman, 2001). Se pueden hallar diferentes definiciones sobre la ecotoxicología, sin embargo, más allá de las diferencias, todas tienen en común dos factores: los agentes tóxicos y el ecosistema (Ferrari, 2006).

2.1 Cuerpos de agua de la Provincia de Buenos Aires

En nuestro país, el conocimiento de la condición sanitaria de los ambientes acuáticos es incompleto y desigual, la evaluación de la calidad de las aguas continentales y el monitoreo integrado de la polución acuática se encuentra restringido tanto geográfica como temporalmente (Ferrari, 2015). Los ríos periurbanos ejemplifican ecosistemas modulados por el hombre y sus actividades, que se desarrollan sobre sus márgenes,

siendo consecuencia esto de una expansión de las áreas urbanas y de industrias que generan residuos no siempre bien tratados y por lo tanto con una importante carga de contaminantes (Evers *et al.*, 1997; Escalona & Winchester, 1994).

Los ríos Reconquista, Luján y Matanza-Riachuelo, ubicados en la provincia de Buenos Aires, son los de mayor importancia por caudal, extensión y porque gran parte de sus recorridos pasan por zonas con gran densidad poblacional (Informe de la Defensoría del Pueblo de la Nación, 2007). Estos ríos son ejes de las tres principales cuencas del Área Metropolitana de Buenos Aires que desembocan en el Río de la Plata (Momo *et al.*, 2003; Defensor del Pueblo de la Nación, 2003; Salibián, 2006; Carballo, 2010; ACUMAR, 2012).

El estuario del Plata es receptor de la mayor red de drenaje del país y la región pampeana, siendo la principal fuente de agua potable para toda el Área Metropolitana, a la vez que recibe vertidos cloacales de la ciudad de Buenos Aires (Borthagaray *et al.*, 2001; Di Pace & Crojethovich, 2001).

2.2 Los ríos como ecosistemas acuáticos

La estructura de un ecosistema tiene en cuenta las características físicas de este y los organismos que lo puedan habitar. Por otro lado, el funcionamiento de este se refiere a los procesos que regulan el flujo de energía y materia en los ecosistemas como consecuencia de la actividad conjunta de sus componentes (Tilman *et al.*, 2014). Entonces, la estructura y funcionamiento de un ecosistema puede verse como las dos caras de una misma moneda. En el caso de los ríos, la estructura engloba variables como la forma del canal, el lecho, las características del agua o la composición de las diferentes comunidades biológicas, mientras que el funcionamiento se refiere a procesos tales como metabolismo, descomposición de materia orgánica y la producción secundaria (Sandin & Solimini, 2009). Aunque tanto la estructura como su funcionamiento se influyen mutuamente, su relación no es sencilla y a menudo una no puede ser inferida a partir de la otra. Mas aun, la contaminación ambiental puede afectar la estructura y el funcionamiento de diferentes maneras (Sandin & Solimini, 2009; Cardinale *et al.*, 2012; von Schiller *et al.*, 2017). Un río,

además de ser un ecosistema, conecta diferentes ambientes que van intercambiando elementos con él. En estas interacciones naturales las relaciones entre los ríos y los ecosistemas terrestres lindantes son complejas y sensibles a ser alteradas por la actividad antrópica. La composición química del agua de los ríos varía a lo largo de su curso y del tiempo, como dice la teoría del “río continuo”, que predice cambios que acontecen en los organismos que lo habitan, según las modificaciones geomorfológicas y fisicoquímicas que se registran en él (Minshall *et al.*, 1985; Foguelman & Brailovsky, 1999).

En la región pampena, la gran producción ganadera y agrícola, genera desechos que son vertidos a los cuerpos de agua cercanos, originando fenómenos de contaminación a partir de fuentes puntuales (ensilados, cámaras sépticas, purines) o difusas (fertilizantes, plaguicidas, materia orgánica, sedimentos y nutrientes de origen ganadero). Las descargas puntuales son fáciles de detectar, mientras que las difusas son difíciles de evaluar y manejar a causa de la pérdida de nutrientes por lixiviación y escorrentía superficial, (Hooda *et al.* 2000; Arreghini *et al.*, 2007; Jergentz *et al.*, 2005; Vilches, 2012).

2.3 El río Reconquista como modelo de estudio de una cuenca hídrica contaminada

Desde hace más de 20 años que el río Reconquista, es estudiado e investigado por nuestro grupo de trabajo en el PRODEA como modelo de estudio de una cuenca hídrica contaminada. Los estudios fueron encarados mediante diferentes bioensayos con organismos que fueron complementados con estudios físicoquímicos de sus aguas en diferentes puntos de su recorrido. La cuenca del río Reconquista abarca una superficie de 1574 Km², con un cauce principal de 82 Km y una red de drenaje que abarca 14 partidos (Salibián, 2006).

El río Reconquista (Figura 1.3) es un típico río de llanura, originado por la confluencia de los arroyos el Durazno, la Choza y la Horqueta, desemboca en el río Luján para luego entrar al estuario del río de la Plata. La cuenca alta se encuentra en una zona con gran actividad agropecuaria, seguida de una con actividad hortícola y urbanizaciones, las cuales vierten sus desechos en algunos de estos arroyos, que alimentan el lago San Francisco.

Este lago, ubicado en el partido de Moreno, se originó a partir de la construcción de la represa Roggero (Figura 1.4), construida entre 1967 y 1972 para reducir desbordes originados por las crecidas del río y que da inicio al cauce principal del río.

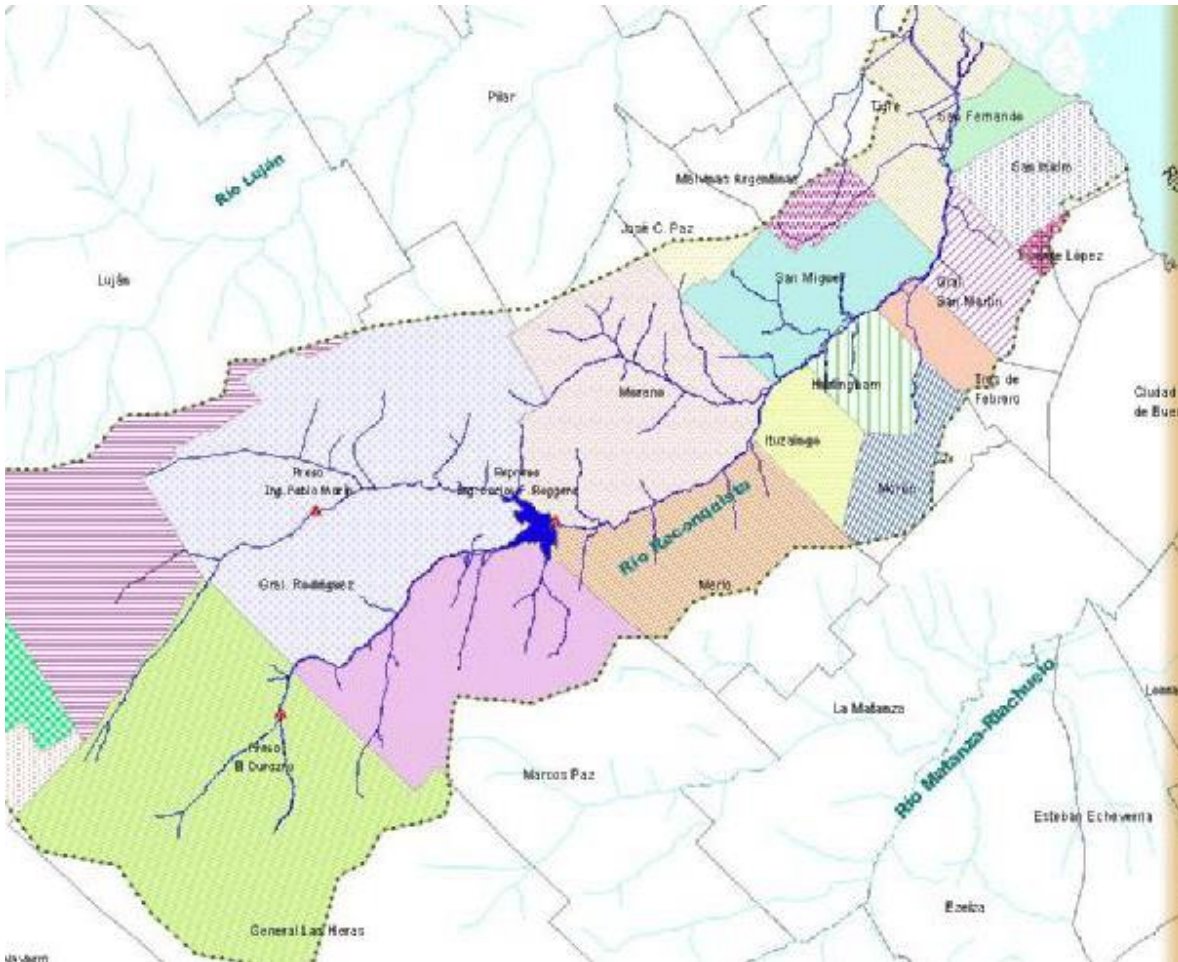


Figura 1.3: Localización geográfica de la cuenca del Río Reconquista, el aporte de caudal de los diferentes arroyos y su recorrido hasta la desembocadura en el río Luján.



Figura 1.4: Fotografía de la represa Roggero, inicio del cauce principal del río Reconquista.

El cauce principal del río recibe a la altura de la cuenca media la incorporación de cursos de agua de cierta importancia provenientes de los arroyos Las Catonas y Morón. La cuenca inferior, aguas abajo del arroyo Morón, se adentra en las terrazas del valle del río Luján, lugar donde se bifurca en los ríos Tigre y Reconquista Chico, y en un tercer canal aliviador (artificial) que ingresan al Delta del Paraná (Informe de la Defensoría del Pueblo de la Nación, 2007). La densidad poblacional presenta una baja distribución en el tramo superior, con aproximadamente unas 72.000 ha destinadas a la actividad agropecuaria. A partir de la cuenca media, la densidad poblacional aumenta a unas 95.000 ha urbanizadas. Según datos preliminares del censo 2010, la cuenca contiene más de 4.6 millones de habitantes, aproximadamente el 12% de la población del país (INDEC, 2010).

El cauce del río Reconquista recibe aportes de contaminación de muy diversa variedad a lo largo de todo su recorrido, por lo que está considerado como el segundo río más contaminado de la Argentina (Salibian, 2006). La represa Roggero puede considerarse como un sitio que transforma los materiales transportados por el río y la calidad de sus aguas, por ejemplo, desechos del tipo cloacal provenientes de los arroyos la Choza y el Durazno, entre otros (Sadañiowski, 2003; Basílico, 2014). No obstante, luego del tramo medio del río y en particular luego de confluir el arroyo Morón, la calidad de las aguas disminuye notoriamente hasta niveles de séptico cloacal (Ferrari, 2015).

2.4 Evaluación de parámetros físico-químicos de las muestras ambientales

La evaluación de la calidad de los ambientes hídricos está considerada por los lineamientos de la Ley nacional 24.051 de residuos peligrosos y su Decreto reglamentario 831/93 y la resolución 2423/93 de la Secretaria de Recursos Naturales y de Ambiente Humano. No obstante, actualmente se carece de la adaptación de los límites sugeridos en los niveles guía a las características particulares de los cuerpos de agua del territorio nacional (Ferrari, 2015).

2.5 índices de calidad de agua (ICA)

La calidad del agua se refiere a las características físico-químicas de una masa de agua dada en relación con los efectos que puede sufrir por procesos naturales, geológicos y las diferentes actividades humanas. Según los usos que el hombre le otorgue, se requieren diferentes grados de calidad de agua, como ser, la calidad del agua debe respetar aspectos ecológicos (tener en cuenta la supervivencia de la biota acuática y su protección), biológicos (considerar el carácter esencial del agua para los seres vivos) y sanitarios (tener en cuenta la protección de la salud y la calidad de vida para la población humana) (Dickson, 1994; Rand *et al.*, 1995; Tyller Miller, 1994; Seoáñez Calvo, 1996).

Los índices de calidad de agua (ICA) proporcionan una herramienta útil para comunicar y evaluar la calidad de una muestra de agua determinada. Se expresan mediante una escala numérica simple que se relaciona directa o indirectamente con el grado de contaminación (valor 0, más contaminado; valor 10, más prístino), permitiendo realizar comparaciones entre diferentes zonas, períodos, y pudiéndose estimar la capacidad de autodepuración del recurso y monitorear el progreso de la contaminación.

Existen diversos índices para estimar la calidad de una muestra de agua, los cuales utilizan distintos parámetros físico-químicos en su cálculo. En esta tesis fueron utilizados el ICAB (Berón, 1984) para indicar contaminación de origen cloacal, y el ICAPI (Lacoste & Collasius, 1995) para indicar contaminación del tipo industrial. Mientras que para el ICAB se utilizan como parámetros el oxígeno disuelto, la demanda química de oxígeno y los dos metales

que se encuentren en mayor concentración en la zona al realizar el muestreo, para el ICAPI se utilizan la temperatura, la concentración de cloruros, la concentración de amonio amoniacal, la demanda biológica de oxígeno y el oxígeno disuelto.

3.1 Evaluación de la contaminación sobre la biota. Bioensayos de toxicidad.

Se define bioensayo a un experimento para estimar la naturaleza, constitución o potencia de un material mediante la reacción que sigue un organismo vivo (Finney, 1978). Un bioensayo típico involucra un estímulo o dosis absorbible que es aplicada a un sujeto cuya respuesta a dicho estímulo es estimada mediante el cambio en algunas características biológicas o el estado del sujeto. Debe tenerse en consideración que los bioensayos ecotoxicológicos acuáticos tienen por objetivo último proveer de conocimiento necesario para proteger a las poblaciones y comunidades de dichos ambientes, de la exposición a diferentes tóxicos en concentraciones que pueden estar asociadas a efectos adversos. Las condiciones experimentales bajo las que se realizan los ensayos deben ser reproducibles y estandarizadas para permitir establecer la validez de una hipótesis determinada. Además, los organismos de ensayo deben preferentemente representar funciones ecológicas relevantes en el ambiente que se evalúa y contar con una importante base de conocimiento biológico. La literatura permite apreciar que existe un alto grado de estandarización para bioensayos que utilizan como puntos finales (*endpoints*) letalidad, supervivencia, reproducción, entre otros, con una gran variedad de especies de prueba y que son aplicables a aguas receptoras, sedimentos y efluentes en condiciones de laboratorio. Sin embargo, en el curso de las últimas décadas, los esfuerzos de los ecotoxicólogos acuáticos se orientan cada vez con mayor intensidad en dirección a la identificación de *endpoints* de efecto temprano (biomarcadores) en especies centinela, cuantificando sus modificaciones luego de estar en contacto con tóxicos particulares o con mezclas de ellos (Lagadic *et al.*, 1997). Estos comprenden una amplia gama de efectos, agudos o crónicos, deletéreos o no, en diferentes niveles de organización, desde el molecular al poblacional.

En función de la extensión y su relación con el tiempo de vida del organismo prueba, se habla de ensayos agudos o crónicos. Los primeros son de tiempo de exposición corto; Por su parte, los ensayos crónicos pueden prolongarse de manera parcial y hasta abarcar todo el ciclo de vida del organismo, estos generalmente consideran exposiciones a concentraciones sub-tóxicas de compuestos puros o mezclas.

La exposición a sustancias tóxicas puede provocar alteraciones de distinto grado desde un desbalance del equilibrio homeostático del organismo hasta la muerte (Figura 1.5). Las variables de tipo fisiológicas, bioquímicas o comportamentales pueden presentar niveles compatibles con los límites homeostáticos o normales, pero según la magnitud de concentración del tóxico y el tiempo de exposición, los daños pueden ser reversibles o irreversibles (Eissa, 2008).

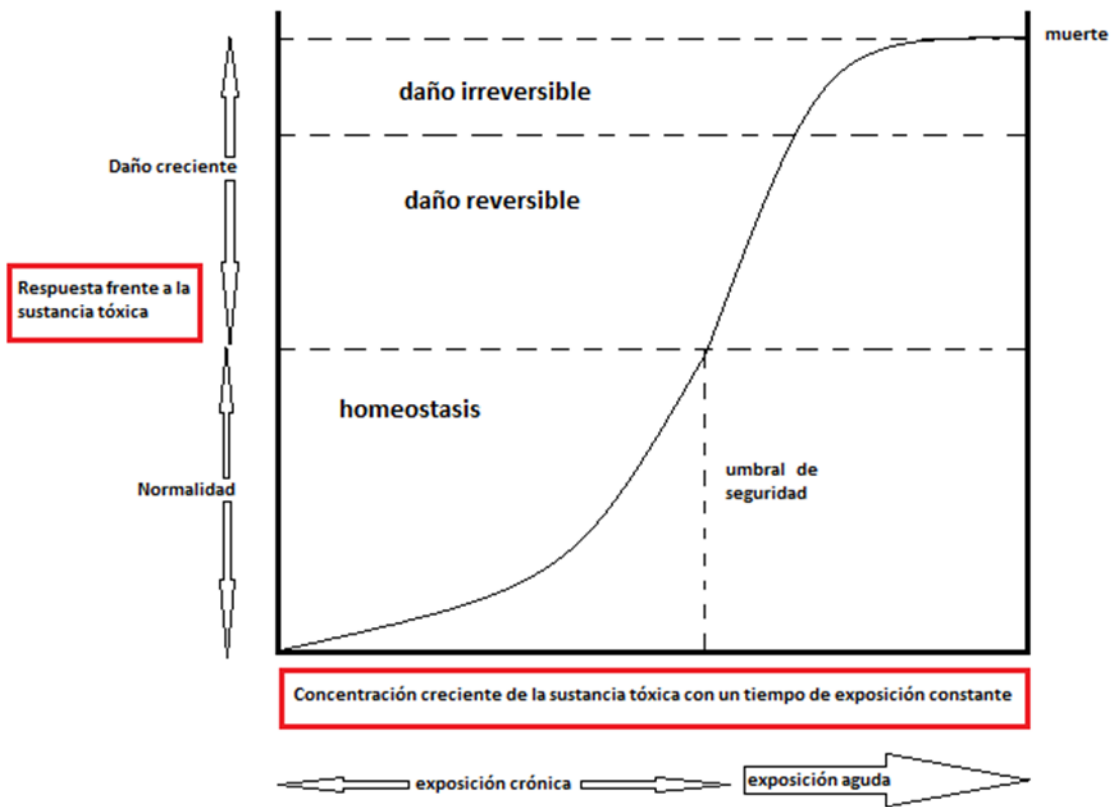


Figura 1.5: Representación de los efectos observados en un organismo en respuesta a una exposición crónica o aguda de un tóxico (adaptado de Eissa, 2008).

Es importante destacar que es valioso incorporar bioensayos en las evaluaciones ecotoxicológicas de los medios acuáticos, ya que de esta forma el resultado se torna más realista al poder complementar la información de estas pruebas en organismos junto con la obtenida de los resultados fisicoquímicos del análisis de la calidad del agua (Ossana, 2011).

3.2 Uso y utilidad de los tóxicos de referencia

Un tóxico de referencia (control positivo) es un compuesto químico orgánico o inorgánico utilizado en pruebas de toxicidad con fines de control de calidad analítica sobre los organismos a utilizar en las pruebas. Para ello, en la etapa inicial del montaje de un método de prueba debe seleccionarse un compuesto soluble, de pureza $\geq 99\%$, al cual se le realicen pruebas de toxicidad para una especie determinada, con el fin de establecer el intervalo de concentración del compuesto seleccionado que produce el efecto esperado. Una vez definido el patrón de la relación dosis-respuesta para el compuesto elegido, puede ser empleado como tóxico de referencia (US EPA, 1994; Castillo Morales, 2004).

Cuando se llevan a cabo ensayos de toxicidad como herramienta dentro de la ecotoxicología, es importante utilizar procedimientos estandarizados que incluyan metodologías con especies validadas que sirvan para comparar entre resultados obtenidos intra e inter-laboratorios. Dentro de estas metodologías, se incluye la evaluación de los tóxicos de referencia sobre especies estandarizadas, tendiendo a maximizar la reproducibilidad y la confiabilidad de los datos obtenidos (Buikema *et al.*, 1982). El uso de tóxicos de referencia conlleva la realización de cartas control, que consisten en la obtención de resultados en ensayos sucesivos bajo idénticas condiciones y el cálculo de la concentración efectiva media, con estos para los organismos de ensayo. Las cartas control, demuestran la sensibilidad del grupo de animales usados, la estabilidad de la respuesta biológica y la repetibilidad de los resultados obtenidos (Mastrángelo & Ferrari, 2013).

3.3 El cadmio (Cd) como contaminante y su utilización como tóxico de referencia

La lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, 2001) incluye a 13 de los 59 elementos metálicos, la cual está encabezada por plomo (Pb)(CAS N 7439-92-1), arsénico (As) (CAS N 7440-43-9) y cadmio (Cd) (CAS N 7440-43-9).

El Cd (Tabla 1.1) es un metal de color plata-blanco y blanco-azulado, brillante, maleable, inodoro, que puede presentarse también como polvo gris-negro. Raramente se lo encuentra en estado puro, suele formar numerosas sales que se encuentran en rocas sedimentarias, asociado al Zinc, suelos, carbón, petróleo, agua, etc., cuya naturaleza es fundamental para su movilidad en ambientes y sus efectos en los ecosistemas(Foulkes, 1986; Eissa, 2008).

Tabla 1.1: Algunas características físico químicas del Cadmio metálico y del Cloruro de Cadmio (CdCl₂)

Características	Cd	CdCl ₂
Masa molar (g)	112.41	183.32
Densidad (δ)	8.642 (25°C)	4.047
Punto de fusión (°C)	320.9	568
Punto de ebullición (°C)	765	960
Solubilidad en agua (g/L)	Insoluble	1400 (20°C)

Las fuentes ambientales del Cd son principalmente la actividad volcánica (la mayor fuente de Cd atmosférico), la actividad industrial (producción de acero, fabricación de baterías, cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, colorantes, aleaciones, fertilizantes, pesticidas, etc.) y las de origen terrestre (cenizas de combustibles fósiles y de incineración de objetos con Cd, la aplicación de agroquímicos, residuos de la manufactura del cemento) (Eissa, 2008).

El uso del Cd dentro del mercado industrial, comenzó a mediados del siglo XX a través de la industria de las baterías recargables de níquel y cadmio, seguido de la galvanoplastia, pigmentos para pinturas, emulsiones fotográficas y tintas de impresoras, entre otros. A

nivel mundial, desde 1990 se estima que anualmente se producen cerca de 20.000 toneladas con un consumo que se mantiene constante (UNEP, 2010). El Cd puede transportarse desde los procesos industriales hacia la atmósfera, desde donde se distribuye a los diferentes compartimientos ambientales, depositándose en la tierra y siendo arrastrado a los cuerpos de agua que es donde se encuentra la mayor reserva de este metal. Una vez en tierra, es absorbido por las partículas del suelo, pudiéndose incorporar en sistemas biológicos o filtrarse a las napas subterráneas y aguas superficiales (Nriagu & Pacyna, 1988; Borthagaray *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 2003). Toda la dinámica de los mecanismos citados, está influenciada por diversos factores como el tipo de suelo, la vegetación, el pH, etc. El Cd puede encontrarse representado por diferentes especies químicas, como, por ejemplo, como ion libre en agua dulce, como carbonato en algún medio alcalino, acompañado con el cloro en el agua del mar. La evidencia ha probado que es un agente que se asocia con el cáncer en seres humanos, por lo que este metal fue clasificado como carcinógeno humano de grupo 1 por la Agencia Internacional de Investigación en cáncer de la organización mundial de la salud (WHO, 1992; IARC, 1993; Flora *et al.*, 2008; Arroyo *et al.*, 2012) por generar efectos citotóxicos que conducen a eventos apoptóticos y necróticos (Rani *et al.*, 2014).

La concentración del metal dentro de los organismos, varía dependiendo del tejido y de su edad (Repetto, 1995). Luego de ser absorbido, se transporta por sangre al hígado y otros órganos del cuerpo (riñones, páncreas, músculo, piel).

En particular, en los peces, el Cd ha sido detectado en mayor concentración dentro del hígado, los riñones y las branquias (Wright & Welbourn, 1994; Kraal *et al.*, 1995; Ollson *et al.*, 1996).

Cuando los organismos acumulan Cd, estos tienden a retenerlo durante mucho tiempo; la vida media biológica dentro de los seres humanos varía con la edad, siendo mayor en niños que en adultos de 20 años. En el 95% de los casos, la excreción ocurre por las heces y la bilis. En hígado, la excreción se realiza en contra de gradiente de concentración mediante enzimas transportadores, generando una concentración en bilis de entre 20-500 veces mayor respecto al plasma. Los riñones son la segunda vía de excreción, y en

aquellos animales que mudan su exoesqueleto, la pérdida del Cd se produce mediante este (Janssen *et al.*, 1991).

El proceso de bioacumulación del Cd está controlado por las propiedades químicas del agua, que determinan la especiación del metal y por lo tanto la forma en que las especies químicas compiten por los ligandos químicos y/o biológicos. El Cd se acumula muy fácilmente en microorganismos e invertebrados terrestres, donde su bio-concentración es del orden de miles (WHO, 1992). En los ambientes acuáticos, el Cd puede bioacumularse en los organismos a concentraciones suficientemente altas como para provocar efectos perjudiciales, sobre todo por la transferencia a través de la cadena alimentaria en el proceso de bio-magnificación.

El Cd es uno de los metales más tóxicos para la biota acuática, disuelto en agua o formando complejos con los sedimentos, constituyendo una fuente de contaminación para varias cadenas tróficas acuáticas (Mebane, 2006; Barhoumi *et al.*, 2009). La toxicidad aguda del Cd varía entre organismos acuáticos incluso entre especies filogenéticamente emparentadas, particularmente con las concentraciones del metal libre (WHO, 1992). La captación de Cd se ve afectada desde el medio por la presencia de iones Calcio (Ca^{2+}) y Magnesio (Mg^{2+}), dado que ambos iones disminuyen (en particular el Ca^{2+} que es efectivo a concentraciones mucho más bajas respecto al Mg^{2+}) la captación del Cd en las branquias de los peces y por ende en su toxicidad (Bentley, 1991). La afinidad de la Ca-ATPasa por el Cd^{2+} parece ser 100 veces mayor respecto al Ca^{2+} , lo que podría explicar su bioacumulación en peces aun en medios con baja concentración (Ueng *et al.*, 1996). En larvas de sapos (*Rhinella arenarum*) a bajas concentraciones del metal, se observó que provocó graves efectos en la estructura de la piel (Ferrari & Salibián, 1999). También se ha observado la deformidad del esqueleto en peces expuestos a bajos niveles de Cd, y la afección en diversos sistemas enzimáticos como los del transporte epitelial, la neurotransmisión, la actividad de oxidasas de función mixta y en el metabolismo intermediario (Larsson *et al.*, 1981; WHO, 1992; Wright y Welbourn, 1994; Almeida *et al.*, 2001). También puede reemplazar al Ca^{2+} en la proteína calmodulina (reguladora en la

transducción de la señal de calcio en la célula), ya que ambos tienen radios atómicos similares y forman complejos con los mismos ligandos (Flik *et al.*, 1987).

Un efecto común de la exposición al Cd en los vertebrados es la hipocalcemia (WHO, 1992; Wright & Welbourn, 1994; Sloman *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2009). También por exposición al Cd se han encontrado alteraciones morfológicas de las branquias de diferentes especies (Bataglini *et al.*, 1993; Verbost *et al.*, 1993; Thophon *et al.*, 2003, Ferrari *et al.*, 2009), sobre el comportamiento natatorio y el nado anormal (Baker & Montgomery, 2001; Sloman *et al.*, 2003; Faucher *et al.*, 2006; Eissa, 2008), alteraciones en varios sistemas enzimáticos (de Almeida *et al.*, 2003; de la Torre *et al.*, 2005), desórdenes en el metabolismo energético (Ferrari *et al.*, 2011), aumento de la frecuencia de micronúcleos a nivel genotóxico (Cavaset *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006; Ossana *et al.*, 2009), entre otros. En la Figura 1.6. se representa de manera general un resumen de la toxicodinámica del Cd a nivel celular.

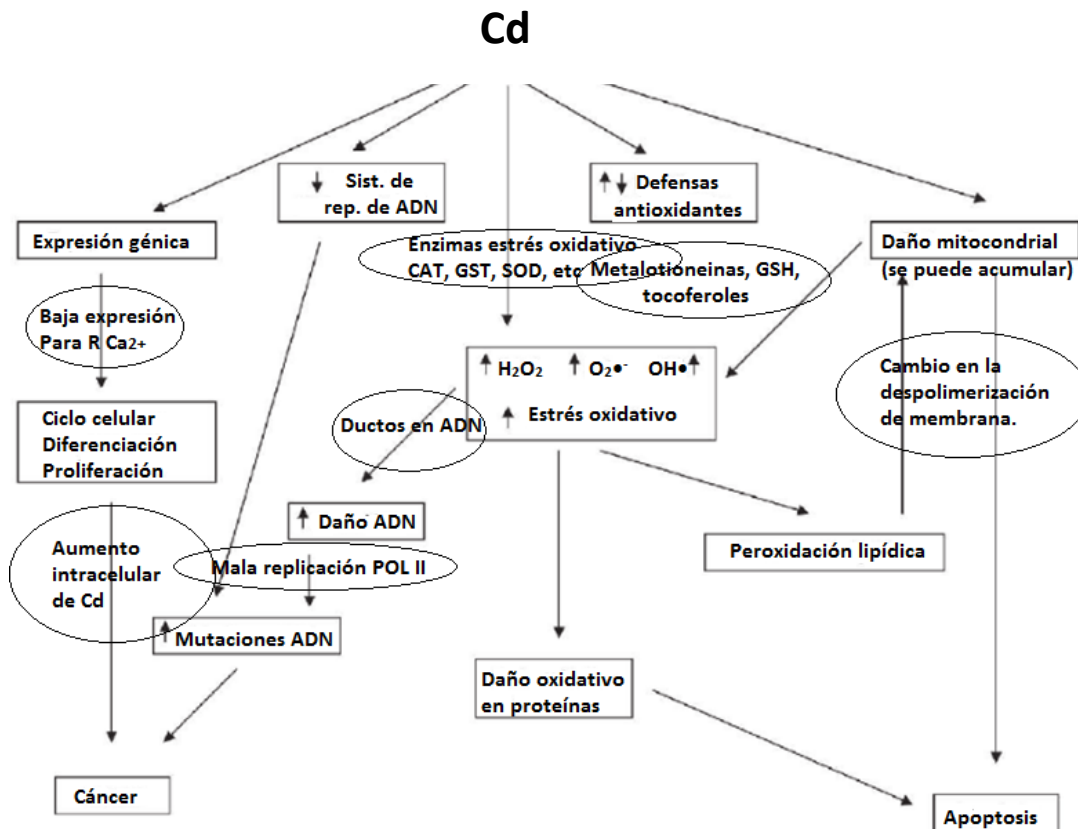


Figura 1.6: Esquema general de los efectos tóxicos producidos por el Cd a nivel celular, resumen de su toxicodinámica (modificado de Romero *et al.*, 2008).

El Cd es uno de los tóxicos recomendados como referente (US EPA, 2001) y es utilizado como tal en ensayos de evaluación ecotoxicológica y particularmente con la especie de ensayo, *Cnesterodon decemmaculatus* (de la Torre *et al.*, 1997; Mastrángelo & Ferrari 2013).

Si bien en ensayos clásicos de letalidad el uso de tóxicos referentes (control positivo) es una condición necesaria para la validación de los resultados y toma de decisiones en el contexto de evaluaciones ecotoxicológicas en general, su uso en ensayos de evaluación de efectos tempranos mediante biomarcadores es prácticamente inexistente. Esta carencia genera un espacio de incertidumbre y debilidad al momento de la toma de decisiones en procesos de monitoreo ambiental, mediante biomarcadores y en particular con las especies nativas, sobre las que se carece de conocimiento profundo de su biología. Entonces resulta necesario aumentar el conocimiento sobre las respuestas biológicas a tóxicos referentes, a fin de incluir los controles positivos en los bioensayos estandarizados con fines de biomonitoreo con especies nativas.

3.4 Los peces como organismos de experimentación

Siendo la clase de vertebrados más diversa, existen alrededor de 30.000 especies descritas de peces hasta el momento, aproximadamente la mitad del total de especies de vertebrados conocidos. Esta riqueza de especies puede verse en la diversidad de formas corporales, fisiología y estilos de vida que también se refleja en la gran variedad de ambientes acuáticos en donde habitan estos organismos (Hickman *et al.*, 2006; Rand, 2008; Chapman, 2009). En particular los teleósteos ocupan gran multiplicidad de nichos ecológicos ocupando diferentes posiciones en la trama trófica, por lo cual, se estudian las potenciales interacciones entre sustancias químicas en los diferentes ambientes y la diversidad de peces, siendo organismos útiles para ensayos ecotoxicológicos (Nagel & Isberner, 1998; Goren, 2015).

Si bien los peces pueden no ser los organismos más sensibles frente a los contaminantes, presentan una amplia gama de hábitos y comportamientos que aumentan su potencial utilidad frente a una exposición a productos químicos en diferentes compartimientos ambientales. Por ello es que merecen especial atención como especies para estudios de monitoreo en ecosistemas acuáticos, ya que los cambios que puedan sufrir a nivel bioquímico o fisiológico sirven como biomarcadores de contaminación y los convierte en organismos aptos para evaluar ambientes acuáticos contaminados mediante la realización de bioensayos (Rand, 2008; Cazenave *et al.*, 2009).

3.5 *Cnesterodon decemmaculatus* como modelo experimental para bioensayos.

La gran mayoría de las especies estandarizadas y validadas para evaluaciones de ecotoxicidad pertenecen al hemisferio norte; las mismas fueron seleccionadas sobre la base de la presencia en sus ambientes y de su profundo conocimiento biológico. Esta situación plantea la necesidad de identificar y estudiar toxicológica y biológicamente el comportamiento de especies que sean representativas de nuestros ambientes, ya que aún en la actualidad la información ecotoxicológica sobre especies neotropicales es escasa.

El poecilido *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), comúnmente llamado “madrecita” (Figura 1.7), es un pequeño pez neotropical, cuya distribución coincide casi en su totalidad con la región Pampeana (Figura 1.8), la cual se extiende ocupando Argentina, parte de Brasil y Uruguay (Bonifacio, 2017). A menudo encontrado en grandes densidades como especie de pez dominante de cuerpos de agua poco profundos (Gómez *et al.*, 1998; Lucinda, 2005), *C. decemmaculatus* puede ser hallado tanto en ambientes prístinos como severamente degradados, considerándolo como especie indicadora de alteraciones ambientales (Hued & Bistoni, 2005; Maggioni *et al.*, 2012).

Se trata de un pequeño pez de unos 2-3 cm de longitud, omnívoro, vivíparo, con marcado dimorfismo sexual (las hembras son de mayor tamaño que los machos, pudiéndose observar en estos a simple vista el gonopodio u aleta anal modificada a órgano reproductor masculino). Es una especie de gran éxito en su estrategia reproductiva, de

rápido crecimiento y corta vida generacional, lo que la hace óptima como especie para cría, mantenimiento en cautiverio y para la realización de bioensayos de evaluación de efectos tóxicos de sustancias o mezclas utilizando diferentes biomarcadores, tanto en ensayos de exposición aguda o crónica (de la Torre *et al.*, 1997, 2002, 2007; Vera Candiotti *et al.*, 2013; Menéndez-Helman *et al.*, 2012; Mastrángelo & Ferrari, 2013; Bonifacio *et al.*, 2016; Ossana *et al.*, 2016). Desde hace algunos años, esta especie ha sido incluida entre los organismos recomendados para su utilización en bioensayos de letalidad (IRAM 29112/2008) y, además, su cría en laboratorio ha sido normatizada (Ferrari, 2017) y diferentes grupos de investigación están realizando estudios sobre su caracterización toxicológica.

En resumen, por su amplia distribución dentro de la región pampeana, la abundancia en los cuerpos de agua donde se encuentra, su fácil mantenimiento y cría en cautiverio, entre otras características, la especie presenta grandes ventajas para ser propuesta como modelo para ensayos ecotoxicológicos de efecto temprano.



Figura 1.7: Ejemplares adultos de ambos sexos de la especie modelo, *Cnesterodon decemmaculatus*.

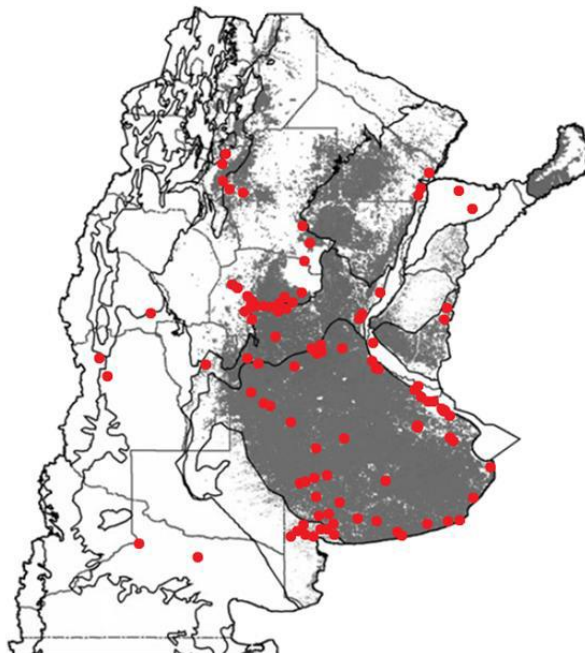


Figura 1.8: Distribución de *C. decemmaculatus* (puntos rojos) (Liotta, 2005) solapada con las áreas modificadas por actividades antrópicas (en gris). Tomado de Bonifacio, 2017.

4.1 Biomarcadores de contaminación

Las respuestas de efecto medidas a nivel individual, celular y subcelular, son comúnmente denominadas biomarcadores y son utilizados para estudiar el impacto de los contaminantes a diferentes niveles de organización biológica (supra o sub individuo). Se ha demostrado en numerosos trabajos, que los biomarcadores tienen poder diagnóstico tanto por exposición como por el efecto generado por los contaminantes, lo que los convierte en herramientas importantes de evaluación de tóxicos (Amiard-Triquet & Brigitte Berthet, 2015; Colin *et al.*, 2016). De este modo, existe una gran variedad de biomarcadores enzimáticos, no enzimáticos, moleculares, genotóxicos, metabólicos, morfométricos, etc., que son utilizados para describir los daños que los tóxicos pueden causar sobre los organismos de ensayo, tanto a mediano como largo plazo, por exposición a diferentes mezclas de contaminantes presentes en el ambiente (Hook *et al.*, 2014).

Existen varias definiciones para el término biomarcador, que, utilizado en un sentido amplio, incluye cualquier tipo de medición que demuestre la existencia de una interacción entre un organismo y el riesgo latente de un agente contaminante presente en el medio,

ya sea de origen químico, biológico o físico (WHO, 1993). Los biomarcadores pueden dividirse en tres categorías: biomarcadores de exposición, de efecto o de susceptibilidad (Figura 1.9) (WHO, 1993; van der Oost, 2003).

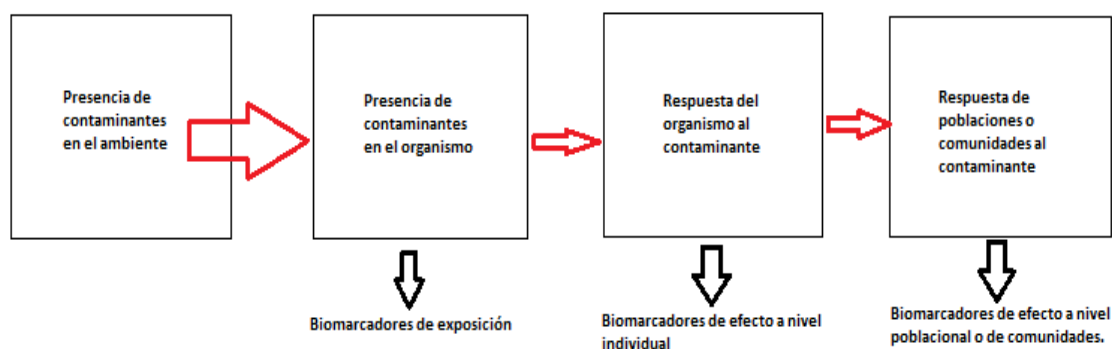


Figura 1.9: Representación de la utilización de biomarcadores en bioensayos para ecotoxicología (adaptado de Lagadic *et al.*, 1997).

Los biomarcadores de exposición permiten medir y detectar sustancias exógenas, metabolitos secundarios o productos de interacción a nivel molecular/celular dentro del organismo, indicando que este ha estado expuesto a un determinado compuesto.

Los biomarcadores de efecto comprenden mediciones fisiológicas, bioquímicas u otras, relacionadas a alteraciones que puedan suceder en el organismo, asociadas a posibles daños por la exposición a contaminantes.

Los biomarcadores de susceptibilidad se refieren a la capacidad adquirida de los organismos de responder frente a una exposición de compuestos contaminantes, incluyendo factores genéticos y cambios en receptores, lo cual altera la susceptibilidad del individuo frente a esa exposición.

Dentro del campo de la ecotoxicología, para detectar efectos subtóxicos en peces, son cada vez más utilizadas las respuestas de un grupo de biomarcadores de distinta índole. La información generada a partir de este tipo de estudios cobra gran importancia como herramienta para la evaluación de los ambientes acuáticos (Sánchez & Porcher, 2009).

4.2 Biomarcadores biométricos

Los biomarcadores biométricos (también llamados morfométricos o somáticos) comprenden un grupo de biomarcadores complementarios que pueden ser utilizados como indicadores del estado de salud general de los peces, debido a que el crecimiento corporal y de determinados órganos puede verse alterado como consecuencia de desórdenes metabólicos y endocrinos producidos por el estrés (Pankhurst & Van Der Kraak, 1997). Entre los biomarcadores biométricos se encuentran los índices morfométricos tales como el factor de condición (FC), que relaciona el peso y longitud e el índice hepato-somático (IHS) y el índice Gónadosomático (IGS), los cuales otorgan información más específica al relacionar la masa de un determinado órgano (hígado o gónadas en el caso del IHS y el IGS respectivamente) con la masa corporal, ofreciendo una ventaja al relacionar directamente los efectos por exposición a un tóxico sobre el órgano blanco. Así, por ejemplo, un decrecimiento de IHS puede indicar un deterioro de la función hepática y un incremento del IHS puede reflejar cambios patológicos como hipertrofia o hiperplasia de células hepáticas (Goede & Barton, 1990). Los daños causados por la exposición a agentes tóxicos pueden provocar lesiones internas, externas o patologías cuyos efectos pueden cuantificarse (Schlenk *et al.*, 2008a; Ferrari *et al.*, 2009).

4.3 Biomarcadores metabólicos

Todos los organismos requieren de energía para su crecimiento, reproducción y para el mantenimiento del metabolismo basal y su homeóstasis. Bajo situaciones de estrés se requerirá energía adicional, y si a esta no la puede proveer la dieta, el crecimiento y la reproducción de los animales puede verse comprometida (Rueda-Jasso *et al.*, 2004). Por esto, el suministro energético es un factor limitante para la realización de los procesos fisiológicos. El estudio del metabolismo energético de un proceso como tal, es relevante para las investigaciones que comprenden este campo de estudio a nivel ecotoxicológico

(Tseng & Hwang, 2008). En particular, los estudios sobre el balance energético en animales acuáticos, son útiles debido a que puede estimarse la manera en que los organismos utilizan la energía para convertirla en biomasa, gametas o la que gastan para compensar variaciones ambientales y así poder mantener su homeostasis. El crecimiento de un individuo está determinado por la masa y el balance de energía, siendo limitado por la fuente de donde proviene y los nutrientes (vitaminas y minerales) que adquieren por medio del alimento (Rosas, 2003).

Los biomarcadores del tipo metabólico son parámetros bioenergéticos que estiman la energía necesaria para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, estudiando el ingreso y egreso de energía dentro del mismo. Al estudiar el ingreso de energía mediante la ingesta de alimento (I) y la asimilación específica (A) de este y el gasto energético obtenido a partir de la tasa metabólica específica (TME) y de la excreción de NH_4^+ (E), se puede conocer el balance final energético calculando el *Scope for Growth* (SFG) o campo de crecimiento. Estos parámetros son útiles porque estiman la energía que requiere un organismo para neutralizar un determinado efecto adverso dentro de un ambiente contaminado, siendo importantes parámetros a nivel fisiológicos como el caso de la TME que integra de manera cuantitativa las inter-conversiones energéticas entre los procesos anabólicos y catabólicos (Hook *et al.*, 2014; Ferrari *et al.*, 2011; Hashemi *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2006). La exposición de organismos a agentes contaminantes involucra inevitablemente un cierto costo energético de las reservas que este posee, lo que genera un gasto energético extra que es requerido para metabolizar el tóxico (Bonifacio *et al.*, 2017; Sancho & Ferrando, 2015; Agbohessi *et al.*, 2014; Cazenave *et al.*, 2006).

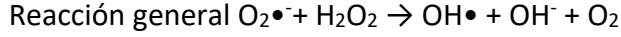
4.4 Biomarcadores bioquímicos

4.4.1 De estrés oxidativo

Estos tipos de biomarcadores comprenden enzimas de biotransformación o antioxidantes que participan en la detoxificación de los tóxicos o de sus metabolitos secundarios.

La gran cantidad de contaminantes que existen en el ambiente, pueden llevar adelante su efecto tóxico al promover el estrés oxidativo (Di Giulio & Meyer, 2008). El peróxido de

hidrógeno (H_2O_2), el radical libre hidroxilo ($\text{OH}\bullet$) o el radical libre superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), son especies reactivas del oxígeno producto de la reducción de este, muy reactivas y deletéreas para los sistemas biológicos por su poder oxidante (Figura 1.10).



El H_2O_2 vía la reacción de Haber Weiss junto con el $\text{O}_2\bullet^-$ sirve como sustrato para la formación de $\text{OH}\bullet$. Si bien el H_2O_2 no es un radical libre, es necesaria su remoción del organismo dado el producto que forma vía reacción Haber Weiss. Estos procesos *a posteriori* oxidan lípidos, proteínas y el ADN, lo que causa variados y adversos efectos sobre la salud en los sistemas biológicos. Existen otras especies reactivas del oxígeno/nitrógeno (EROs/ERNs) que también se producen, como el óxido nítrico (NO), el radical peróxido ($\text{O}_2\bullet^{-2}$), los radicales alcoxilos ($\text{RO}\bullet$), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), etc. (Hermes Lima, 2004; Scandalios, 2005; Vargas *et al.*, 2007; Newman & Clements, 2008; Timbrell, 2009).

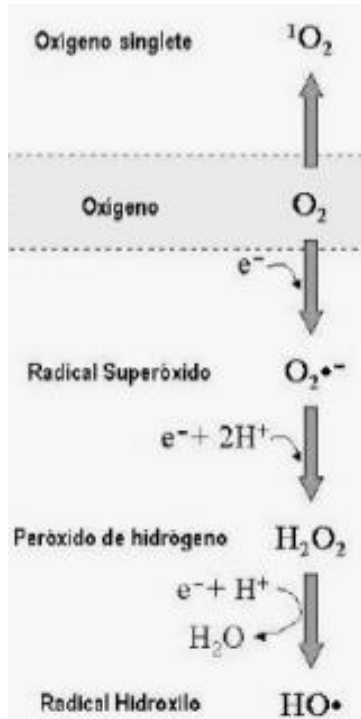


Figura 1.10: Formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Vargas *et al.*, 2007)

Los diferentes organismos acuáticos que están expuestos a sustancias tóxicas dentro de los cuerpos de agua, ya sea por sedimento, material particulado, en el alimento, etc., sufren el desbalance que se produce entre la generación y la eliminación de los radicales libres (Lushchak, 2011). Los metales pesados, los herbicidas, los compuestos aromáticos, etc., producen un desbalance en el equilibrio óxido reducción que aumenta las EROs y es por ello, que son estudiadas en relación a las sustancias tóxicas ambientales en estudios ecotoxicológicos. Los seres vivos cuentan con defensas antioxidantes para hacerle frente a estas moléculas, que son además producidas en procesos normales como la respiración celular, pero ante la presencia de contaminantes ambientales se altera el equilibrio por la mayor producción de EROs que conduce a una situación de estrés oxidativo.

Los mecanismos de defensa antioxidante frente al daño oxidativo provocado por las EROs, están formados por sistemas enzimáticos, como ser la catalasa (CAT) y la glutatión-S-transferasa (GST), y por sistemas no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH).

La CAT cataliza por degradación del peróxido de hidrógeno, que al igual que las peroxidasas, son enzimas que se encuentran presentes en la mayoría de los organismos aerobios y todos los animales vertebrados. La localización celular de la CAT en vertebrados, es principalmente en los peroxisomas (Hermes-Lima, 2004; Schlenk *et al.*, 2008b).

La GST es una familia de enzimas de fase II, diméricas, que se distribuyen ampliamente por el citosol de las células hepáticas, siendo su rol principal la detoxificación de los productos de estrés oxidativo que surgen de la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, catalizando la conjugación de GSH con los contaminantes. El 4-hydroxynonenal (4HNE), un aldehído insaturado particularmente reactivo que es generado durante la peroxidación lipídica como resultado de la degradación de ácidos grasos poli-insaturados, es catalizado a otro menos reactivo (Hermes-Lima, 2004; Di Giulio & Mayer, 2008).

Por el lado de los sistemas no enzimáticos, el GSH es un tripéptido clave en la respuesta detoxificante, que sirve de cofactor en las reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima glutatión peroxidasa (GPx) y la GST, aunque también puede eliminar EROs directamente. Principalmente su función es detoxificante, conjugando intermediarios

electrofílicos vía GST y como oxidante fuerte (Hermes-Lima, 2004). En la Figura 1.11 se esquematizan las reacciones químicas correspondientes a las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas.

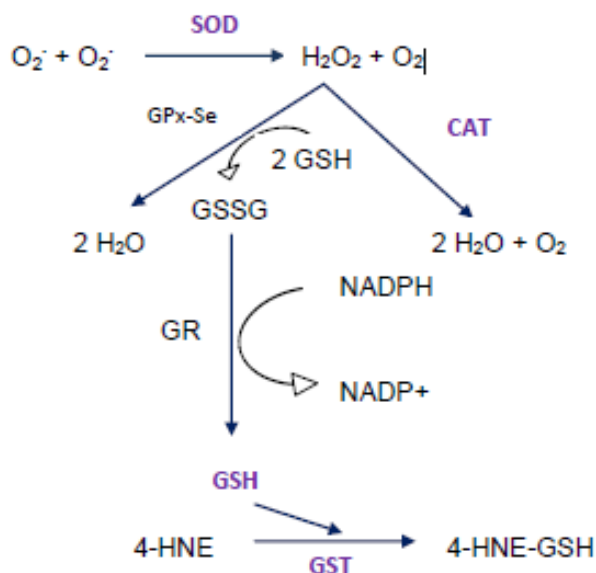


Figura 1.11: Esquema general de reacciones químicas correspondientes a los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa; GPx-Se: glutatión peroxidasa selenio dependiente; GR: glutatión reductasa; GST: glutatión-S-transferasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; 4-NHE: 4-hidroxinonenal.

4.4.2 De daño en sistema nervioso

La determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) se adopta como biomarcador de alteraciones ocurridas en las uniones sinápticas en el sistema nervioso central, uniones neuromusculares colinérgicas y parasimpáticas. Es una enzima perteneciente a la familia de las esterasas, que hidroliza al neurotransmisor acetilcolina liberado por la neurona presináptica al espacio sináptico de las neuronas colinérgicas dándole terminación al proceso de la neurotransmisión. La determinación de su actividad ha sido utilizada en muchos trabajos del campo de la ecotoxicología (Figura 1.12) (Bradbury *et al.*, 2008; Menéndez-Helman, 2015).

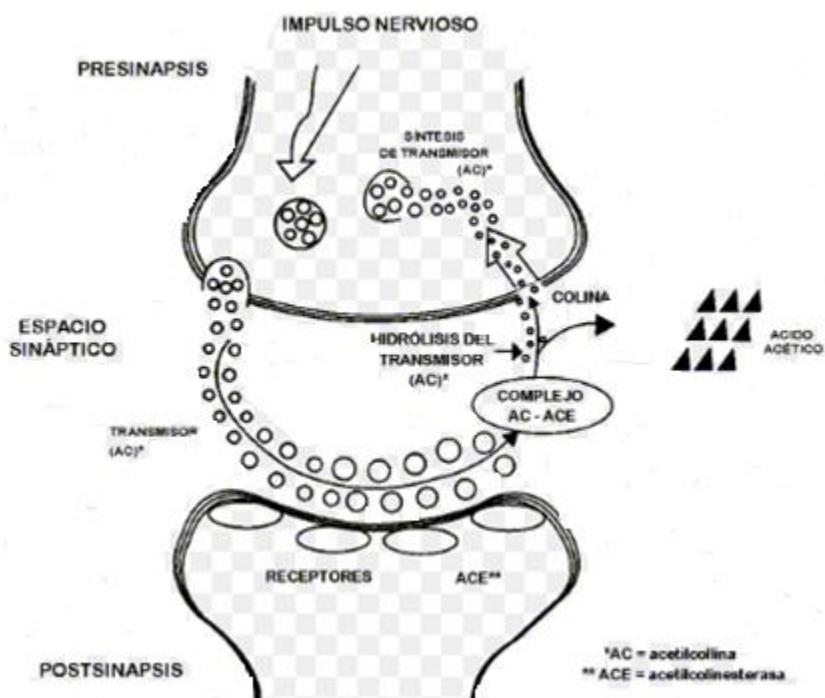


Figura 1.12: Representación del impulso nervioso entre neuronas de la sinapsis colinérgica (internet:www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_ambiental/tema12/tema%2012-sinapsis-colonergica.htm).

Es sabido que diferentes insecticidas, tales como, organofosforados o carbamatos, tienen como sitio blanco de acción a esta enzima, la cual queda inhibida para realizar su función, convirtiéndola en un biomarcador muy sensible para estudiar los efectos producidos por este tipo de plaguicidas (van Dyk & Pletschke, 2011). Como resultado de la inhibición de la AChE, se acumula acetilcolina en la hendidura sináptica que genera una sobreestimulación en los receptores de membrana de la neurona postsináptica que termina en una parálisis o eventual deceso del organismo (Bonifacio, 2017). Varios estudios han indicado que la AChE tanto de cerebro como las de músculo, son sensibles también a otro tipo de contaminantes neurotóxicos como los metales pesados, piretroides y herbicidas (Salbego *et al.*, 2010; Richetti *et al.*, 2011). En particular en peces, la actividad de AChE es muy importante para muchos procesos fisiológicos como la locomoción, evasión de predadores, localización de presas, las interacciones sociales, la alimentación, etc. En *Cnesterodon decemmaculatus*, se ha reportado la inhibición de AChE por la exposición de

contaminantes presentes en el ambiente como metales pesados y herbicidas (de la Torre *et al.*, 2002; Menéndez-Helman *et al.*, 2012).

5.1 Consideraciones acerca de la variabilidad de los biomarcadores

5.1.1 Valores basales de los biomarcadores (línea de base)

Las líneas de base de los biomarcadores se obtienen de aquellos resultados en animales control, ya sean provenientes de campo o laboratorio, con las cuales se comparan luego los valores obtenidos para los biomarcadores estudiados en animales que son expuestos a un determinado ambiente tóxico. Estos resultados indican el valor de referencia o “natural” en condiciones fisiológicas normales para cada uno de los biomarcadores analizados (Ascar, 2006). De esta forma, queda representada la variabilidad intraespecífica para cada uno de los parámetros que se estudian, brindando una aproximación de los niveles de respuesta esperados para cada biomarcador según las vías de exposición que sean evaluadas (Scarcia, 2014). Hay que tener en cuenta que los valores basales de biomarcadores para animales estandarizados que son criados en cautiverio, bajo condiciones controladas de laboratorio, pertenecen a lotes de animales genéticamente más homogéneos, a diferencia de aquellos animales nativos que presentan, *a priori*, una mayor variabilidad genética y que por su parte están expuestos a una mayor cantidad de variables físico-químicas del ambiente en el cual se encuentran (Balk *et al.*, 1996).

5.1.2 Variabilidad estacional de los biomarcadores

El uso correcto de las respuestas biológicas como biomarcadores, requiere de un conocimiento de la variabilidad natural, cambios estacionales de factores bióticos y abióticos tales como metabolismo, ciclos sexuales, estado nutricional, temperatura, entre otros (Livingstone, 1993). En un contexto ambiental, los biomarcadores pueden sufrir fluctuaciones temporales y en respuesta a cambios en el desarrollo del organismo (Wendelaar Bonga, 1997). No solo los factores ambientales, sino también la estacionalidad puede influir en la variabilidad de las respuestas de determinados biomarcadores (Sanchez *et al.*, 2008; Nahrgang *et al.*, 2010). Por ejemplo, en peces, la caracterización intrínseca de la actividad estacional de la enzima AChE ha sido estudiada

en *Cnesterodon decemmaculatus* para ser utilizada como biomarcador de toxicidad en bioensayos, obteniéndose información valiosa para el uso de esta enzima en ensayos con peces nativos (Menéndez-Helman, 2015).

5.1.3 Evaluación integral de biomarcadores mediante la aplicación de índices

Como se vio en los puntos anteriores, es muy amplia la batería de biomarcadores o puntos finales que existen, tales como los biométricos, metabólicos, enzimáticos, no enzimáticos, genotóxicos, moleculares, etc., que son utilizados para poder describir de la mejor manera posible los resultados obtenidos que pueden ser causados sobre los organismos al estar expuestos tanto a mediano como a largo plazo, a diferentes mezclas de contaminantes liberados al medio ambiente (Hook *et al.*, 2014). También, de manera directa o indirecta por situaciones meramente fisiológicas o biológicas, las respuestas de biomarcadores en los organismos frente a situaciones de estrés pueden terminar siendo muy variables dentro de un mismo grupo en donde todos los animales se enfrentan al mismo ambiente. Termina siendo inevitable entonces que, sumado a la existencia de la variabilidad individual, se tengan en cuenta los procesos homeostáticos adaptativos en respuesta a la exposición a un contaminante o a una mezcla de estos y las respuestas de los biomarcadores en función de las condiciones de vida particulares de los animales expuestos. Particularmente, dentro de un contexto de monitoreo ambiental en donde los resultados a partir de bioensayos terminan siendo claves para determinar posibles ambientes que sufren algún tipo de contaminación, las respuestas individuales de los distintos biomarcadores pueden mostrar un rango amplio en sus valores, que muchas veces se torna difícil de diferenciar respecto al rango de respuesta obtenido en los grupos control.

Siempre debe tenerse en cuenta que los animales responden al estrés como un todo, por ello resulta razonable evaluar su respuesta en igual sentido. Es por ello que, en los últimos años, distintos estudios resaltan la importancia de utilizar biomarcadores a diferentes niveles de respuesta biológica, que provean un resultado integrado sobre el estado de los organismos que habitan ambientes acuáticos poluídos, los cuales evalúan la respuesta integrada de los organismos mediante la aplicación de índices que integran biomarcadores

de diferentes categorías (Ossana, 2011; Maggioni *et al.*, 2012; Scarcia, 2014). Sí bien el uso de índices puede resultar muchas veces laborioso, la aplicación de métodos que combinen las respuestas de varios biomarcadores, contribuye a la clarificación de los resultados que se obtienen, permitiendo unificar información en un solo dato que pueda resumir la respuesta integrada del animal en un ambiente estresante (Vieira *et al.*, 2014; 2016). En resumen, el uso de estos índices colabora en la evaluación integral y minimiza la incertidumbre generada por la variabilidad de base de los distintos biomarcadores analizados de manera individual, resultando promisorio su utilidad en estudios de monitoreo con fines comparativos, en función de la estacionalidad, de las muestras y de la especie prueba utilizada.

CAPÍTULO 2

Hipótesis y objetivos

1 Hipótesis

Las aguas superficiales de los ríos periurbanos son receptores de contaminantes de distinta índole que, de manera individual o en mezclas, ejercen efectos adversos en la biota en general y en la ictiofauna allí presente en particular.

La **Hipótesis** de trabajo de esta Tesis se basa en que el deterioro de la calidad de estas aguas receptoras repercute en la viabilidad funcional de los peces expuestos a ellas, pudiendo provocar cambios en algunos de sus parámetros funcionales basales, superando los límites de sus capacidades homeostáticas y promoviendo respuestas en parámetros biomarcadores a distintos niveles de complejidad biológica (biométrica, fisiológica y bioquímica). De tal modo, el estudio de estos parámetros de efecto en un pez teleósteo nativo contribuye en la evaluación de la calidad ecotoxicológica de dichos cuerpos de agua.

La **Hipótesis específica** que se pone a prueba es: la especie dulceacuícola *Cnesterodon decemmaculatus* expuesta en condiciones de laboratorio a estrés ambiental por contaminación pone de manifiesto sus efectos mediante la alteración de un espectro amplio de parámetros bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que alteran algunas de las funciones básicas de los individuos y su *fitness*.

2 Objetivo general

Se propone aportar información de calidad que contribuya a la validación de un pez nativo (*Cnesterodon decemmaculatus*) como organismo modelo en evaluaciones de contaminación de aguas continentales sobre la base de la caracterización de su respuesta ecofisiología y ecotoxicológica en un escenario experimental que integre información referente a biomarcadores bioquímicos, metabolismo energético e índices somáticos.

3 Objetivos básicos

-Aportar información de índole biométrica, fisiológica y bioquímica, potencialmente útiles como parámetros biomarcadores de respuesta temprana, para su uso en el teleósteo *Cnesterodon decemmaculatus* como especie modelo de ensayo, en estudios de monitoreo ambiental en el contexto de un bioensayo de evaluación de efecto temprano diseñado a tal fin.

-Evaluar la incidencia de la estacionalidad en las respuestas de estos biomarcadores.

4 Objetivos particulares

-Establecer las líneas de base y la variabilidad de los parámetros biológicos estudiados en la especie, según las estaciones climáticas del año.

-Caracterizar la respuesta de los distintos biomarcadores a una concentración sub-tóxica de cadmio, proponiéndolo como tóxico referente.

-En individuos expuestos a aguas receptoras, se propone identificar biomarcadores significativamente sensibles respecto a controles.

-Integrar las respuestas de los distintos parámetros biológicos medidos en índices potencialmente útiles como puntos finales (*endpoints*) de efecto temprano.

CAPÍTULO 3

Materiales y métodos

En esta sección se indican los materiales y métodos generales en tanto que los particulares se detallan en los capítulos de resultados correspondientes.

1 Animales test utilizados en los bioensayos

Se utilizaron ejemplares adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) de ambos sexos, provenientes de cultivos del PRODEA (Programa de Ecofisiología Aplicada). La cría y mantenimiento de los peces se efectuó según el manual de procedimiento establecido en Ferrari *et al.* (2017).

Básicamente, el mantenimiento y cría en cautiverio de madrecitas dentro del laboratorio se efectuó según dos modalidades: cultivos *outdoor* (en estanques de cría a la intemperie) y cultivos *indoor* (dentro del laboratorio con condiciones controladas), los cuales coexisten y se vinculan. Las poblaciones naturales de las que provienen los ejemplares de inicio y enriquecimiento posteriores de los cultivos son de cuerpos de agua aledaños a la Ciudad de Luján con muy bajo grado de contaminación, considerados como sitios de referencia, principalmente del arroyo las Flores. Ambos tipos de cultivos utilizan agua no clorada de la red de la Universidad de Luján, cuyo perfil fisicoquímico se detalla a continuación (valores tomados de Ossana, 2011):

pH: 7.8-8.6

Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$): 843-1021

Dureza ($\text{mg CaCO}_3/\text{l}$): 60-90

Oxígeno disuelto ($\text{mg O}_2/\text{l}$): 6.1-8.0

2 Diseño experimental

Se realizaron 4 ensayos, 1 ensayo por cada estación climática:



A su vez, cada ensayo fue dividido en dos sub-ensayos destinados a la evaluación de:

Biomarcadores metabólicos/ balance energético

Biomarcadores bioquímicos y morfométricos

2.1 Medios de exposición

Se utilizaron los siguientes medios experimentales:

-Control negativo, **MHW**: el medio de dilución y control fue agua reconstituida moderadamente dura (MHW) de la siguiente composición (mg/l): 96 NaHCO₃, 60 CaSO₄ . 2 H₂O, 122.7 Mg SO₄. 7 H₂O, 4 KCl; pH: 7 - 7.4; dureza: 80-100 mg CO₃Ca/l (USEPA, 1993; Weber, 1993)

-Control positivo, **Cadmio 0.5 mg/l** (concentración nominal) en MHW: la concentración de exposición se preparó por dilución a partir de una solución stock de CdCl₂ . 2.5 H₂O en agua destilada de 1000 mg Cd/l.

-Muestras ambientales: Las muestras ambientales de agua provinieron de las nacientes del río Reconquista (**RR**) luego de la Represa Roggero (34° 41' 3''S y 58° 51' 15.5''O). Para los bioensayos, las muestras se conservaron en frío (5°C, en bidones de 20 l de polipropileno) hasta su utilización. Previamente fueron filtradas o centrifugadas a baja velocidad para disminuir la cantidad de material particulado en suspensión.

2.2 Diagrama de ensayo

Todos los ensayos fueron realizados de la misma forma, con una extensión de 12 días, precedidos por un período de aclimatación de 14 días y un mínimo de dos réplicas por tratamiento.

-*Etapa de Aclimatación*: los animales seleccionados aleatoriamente del *stock* de adultos en cultivo *indoor*, fueron distribuidos en acuarios (de 15cmx15cmx20cm) con dos litros del medio de cultivo (agua de red no clorada) y colocados en cámaras termocicladas a 23±1°C, fotoperíodo de 16h luz/8h oscuridad y aireación constante.

La carga de organismos/l de medio fue del orden de 500 mg/l, y la alimentación fue diaria, de manera *ad libitum*, con comida para peces levemente molida (marca TETRA FIN *goldfish* en escamas), con la siguiente composición en mg/g de alimento: 41 proteínas, 14,8 lípidos, 27,1 hidratos de carbono, 8,1 cenizas y 9 humedad (9 mg/g) (valor energético del alimento, 1.823 J/mg).

Durante este periodo los animales se adaptaron paulatinamente a las dimensiones de los acuarios de ensayo, al ambiente experimental de las cámaras, al manipuleo diario y al medio de ensayo control. Para ello, cada 48 h el agua de red fue reemplazada parcialmente por MHW hasta alcanzar 100% de MHW luego de 7 días.

-*Etapa de Exposición*: Al inicio del período de exposición, los animales de cada acuario fueron pesados de manera individual, reagrupados de a 10-15 ejemplares por pecera y éstas separadas aleatoriamente en tres grupos: control MHW, expuestos a RR y expuestos a Cd. La biomasa total por pecera se estimó como la suma de los pesos individuales a tiempo inicial de exposición y la ración de alimento diaria ofrecida a cada réplica se calculó

como el 2% de la biomasa total por acuario, y fue corregida a diario según la mortalidad registrada en cada réplica. La renovación del medio fue cada 96 h. Previo a la renovación, el agua del río Reconquista centrifugada se llevó a la temperatura del ensayo y se oxigenó a valores de oxígeno disuelto estándar.

La mortalidad se expresó como % de mortalidad acumulada en función del tiempo por tratamiento.

Con excepción de la alimentación, las condiciones experimentales se mantuvieron constantes desde el inicio de la aclimatación y durante todo el tiempo que duró el ensayo. En todos los tratamientos y de manera regular se tomó registro de los siguientes parámetros fisicoquímicos: Oxígeno disuelto, pH, conductividad, dureza y concentración de Cd.

2.2.1 Sub-ensayo de biomarcadores metabólicos

Mediciones diarias

En cada réplica de los tres tratamientos de los 4 ensayos, se registraron los siguientes parámetros:

- Ingesta (I).
- Producción de heces (H).

Mediciones a tiempo final de exposición

A un grupo de animales seleccionados aleatoriamente de cada tratamiento se les midieron los siguientes parámetros a tiempo inicial y final de exposición:

- Consumo de oxígeno (R).
- Excreción de amonio (E).

A partir de los datos obtenidos se calcularon los siguientes parámetros:

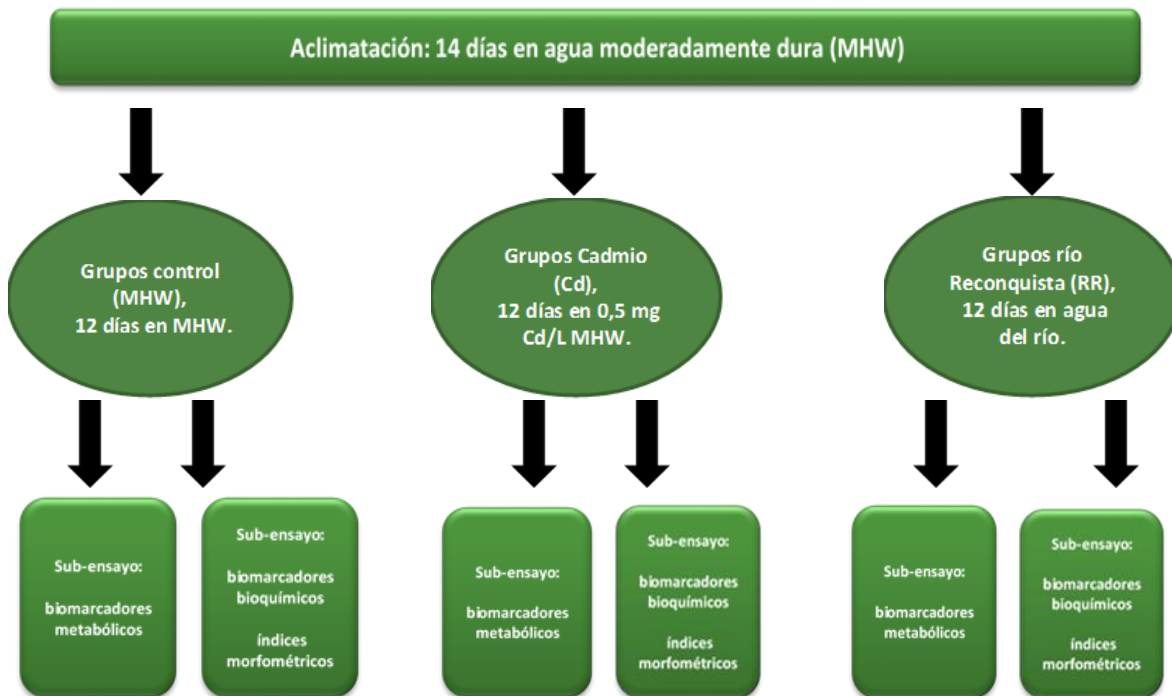
- Asimilación específica (A).
- Tasa metabólica específica (TME).
- Eficiencia de extracción de oxígeno (OEE, %).
- Cociente de amonio (CA).
- Campo de crecimiento (*Scope for Growth*, SFG).

2.2.2 Sub-ensayo de biomarcadores bioquímicos e índices biométricos

A tiempo final de exposición, un grupo de animales elegido aleatoriamente entre los sobrevivientes de cada tratamiento se seleccionó para determinar:

- Factor de condición (FC).
- Índice hepatosomático (IHS).
- Índice Gonadosomático (IGS, en hembras).
- Catalasa (CAT) en hígado.
- Glutación-S-transferasa (GST) en hígado.
- Glutación reducido (GSH) en hígado.
- Acetilcolinesterasa (AChE) en cerebro.
- Proteínas (Pr) en cerebro e hígado.

En el siguiente diagrama se resume el diseño experimental general:



3 Metodología para la obtención y procesamiento del material biológico

Al final del tiempo de exposición, los animales fueron anestesiados en frío durante 2-3 minutos, pesados en balanza analítica (balanza Mettler Toledo, MS 105DU, ± 0.01 mg) y

medidos con calibre digital (Stainlesshardened ± 0.01 mm). Luego fueron sacrificados por incisión cervical sobre una plancha de parafina refrigerada a fin de extirpar los órganos a utilizar bajo lupa. Se les extrajo hígado (h), cerebro (c) y ovario (o). Todos los órganos fueron rotulados por tratamiento/ejemplar y pesados en balanza analítica (± 0.01 mg). Las gónadas se conservaron en solución fijadora y los restantes órganos extraídos se colocaron en microtubos Eppendorf de 1.5 ml y fueron refrigerados en freezer a -80°C hasta su posterior procesamiento.

4 Puntos finales/ endpoints

4.1 Parámetros metabólicos

4.1.1 Metabolismo energético

4.1.1.1 Ingesta (I)

Previamente a la distribución de la ración de alimento diaria, en cada réplica se extrajeron y pesaron los animales muertos a fin de recalcular y corregir la ración de alimento en función de la biomasa. La dieta fue ofrecida por la mañana durante 1 h, luego se retiró el remanente mediante la aspiración del mismo (sifoneo), se lo filtró y secó a 60°C en estufa hasta peso constante. La ingesta fue calculada como la diferencia entre el peso del alimento ofrecido y el peso del alimento remanente, y se expresó como mg alimento/mg biomasa/día.

4.1.1.2 Producción de heces (H)

Antes de la alimentación del día, se recolectaron las heces mediante sifoneo, se las filtró y secó en estufa a 60°C hasta peso constante. La producción de heces se expresó como mg heces producidas/mg biomasa/día.

4.1.1.3 Asimilación específica (A)

A partir de los valores obtenidos de I y H se calculó la A como $A=I-H$ (Alcaraz & Espina 1997).

Estos tres parámetros fueron transformados a unidades energéticas y expresados en Joules/gramopeso húmedo/día (J/g PH/día) para cada réplica de cada uno de los tratamientos.

4.1.1.4 y 4.1.1.5 Consumo de oxígeno (R) y excreción de amonio (E)

A un grupo de animales seleccionados aleatoriamente de cada tratamiento, con un periodo de 24 h de ayuno, se los utilizó para medir consumo de oxígeno (R) y excreción de amonio (E). Cada ejemplar fue colocado de manera individual en un respirómetro de acrílico cerrado (volumen de 40 ml) de manera hermética que contenía MHW aireada en un sistema de flujo de agua abierto por 1 h (tiempo de aclimatación en el respirómetro). La permanencia se prolongó durante otra hora con el sistema de flujo de agua cerrado (tiempo de permanencia). A tiempo inicial y final de permanencia en el respirómetro con el flujo de agua cerrado, se midió el oxígeno disuelto con sensor Hach (límite de detección 0.1 mg/l) y se calculó R (mg/l) como la diferencia existente entre la concentración de O_2 inicial (DO_i) y final (DO_f) de cada respirómetro.

Además, a tiempo inicial y final de permanencia de cada animal dentro del respirómetro, se tomaron muestras del medio (10 ml) para la determinación de la concentración de amonio excretado. Las muestras se conservaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior medición a las 72-96 h mediante un sensor ión específico (Mettler Toledo, sensibilidad $\pm 2\%$). E se expresó en $\mu\text{g NH}_4/\text{g PH/h}$.

Los animales fueron pesados al final del periodo de permanencia en el respirómetro.

4.1.1.6 Cociente de amonio (CA)

Con los valores obtenidos de R y E, se calculó el cociente de amonio como $CA = \text{moles de NH}_4 \text{ excretado} / \text{moles de O}_2 \text{ consumidos}$ (De Boeck *et al.*, 1995; Owen *et al.*, 1998).

4.1.1.7 y 4.1.1.8 Tasa metabólica específica (TME) y eficiencia de extracción de oxígeno (EEO)

La tasa metabólica específica (TME) se calculó para cada individuo a partir de la medición de R como mg de O₂ consumidos/g peso húmedo/h y la eficiencia de extracción de oxígeno (OEE) por hora se calculó como = $(DO_i - DO_f) * 100 / DO_i$ (Espina *et al.*, 2000).

4.1.1.9 Campo de crecimiento (Scope for Growth, SFG)

El Campo de crecimiento (*Scope for Growth*, SFG) fue calculado como: $SFG = A - (R + E)$; donde A es asimilación específica media/réplica, R el consumo de O₂ y E la excreción de NH₄. Los resultados se expresaron como J/g PH/día (Roast *et al.*, 1999).

4.2 Biomarcadores morfológicos

4.2.1 índices biométricos

Se calcularon los siguientes Índices biométricos:

1) Factor de Condición (**FC**) mediante la fórmula: $FC = (\text{mg peso corporal} / \text{mm longitud estandar}^3) * 100$ (Sloof *et al.*, 1983).

2) Índice Hepato-somático (**IHS**): $(\text{mg peso hígado} / \text{mg peso animal}) * 100$ (Smolders *et al.*, 2002).

En el caso de los ejemplares hembra, a las que se les extrajo el ovario, se calculó:

3) índice Gónado-somático (**IGS**): $(\text{mg peso ovario} / \text{mg peso animal}) * 100$ (Devlaming *et al.*, 1982).

4.3 Biomarcadores bioquímicos (enzimáticos y no enzimáticos)

La determinación de estos biomarcadores se realizó en 10 ejemplares seleccionados al azar de los sobrevivientes de cada tratamiento y en los controles. La medición de los marcadores bioquímicos se realizó sobre homogenatos de cada órgano en estudio (cerebro e hígado) como se explica a continuación:

4.3.1 Realización de homogenatos

4.3.1.1 Cerebro

Los cerebros enteros de cada ejemplar que se habían colocado dentro de microtubos Eppendorf a -80°C , se descongelaron y se pesaron en balanza analítica (± 0.01 mg). Luego se homogeneizaron con homogeneizador de vidrio con mango de teflón durante 1 min a 3000 rpm en frío, en una relación $\text{mg cerebro} \times 50 = \mu\text{l}$ de buffer Fosfato-pH 8 ($\text{PO}_4\text{HK}_2 / \text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) 0.1 M. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 10000 g a 4°C en centrifuga Eppendorf 5810 R, se descartó el *pellet* y se guardó el sobrenadante (en freezer a -80°C) en caso de no realizar determinaciones en ese momento.

Cuando el volumen del homogenato era menor a 100 μl se hizo *pool* de dos cerebros.

4.3.1.2 Hígado

Los hígados enteros de cada ejemplar que se habían colocado dentro de microtubos eppendorf de 1.5 ml a -80°C , se descongelaron se pesaron en balanza analítica (± 0.01 mg) y se homogeneizaron con buffer de homogeneización post-mitocondrial (BHPM) en la relación tejido: buffer (1:8 peso/volumen). Se centrifugaron a 10000 g, 4°C durante 10 minutos en centrifuga Eppendorf 5810 R. Las alícuotas de ese sobrenadante se guardaron en freezer a -80°C hasta su posterior uso.

4.3.2 Determinaciones bioquímicas

4.3.2.1 Acetilcolinesterasa cerebral (AChE) (EC 3.1.1.7)

La actividad de AChE fue determinada en el cerebro utilizando una adaptación de la metodología básica propuesta por Ellman *et al.*, (1961). Una vez obtenido el homogenato de cerebro, a 25 μl del sobrenadante de este se le agregan (en cubeta de cuarzo de 1.5 ml) 1.4 ml de buffer fosfato pH 8, 0.1M (KH_2PO_4 0.2M y K_2HPO_4 0.2M), 50 μl de DTNB (ácido ditiobisnitrobenzoico, 0.01 M en buffer fosfato pH 7.0) y 10 μl del sustrato (ioduro de acetiltiocolina, 0.075M), se mezcló por inmersión y se midió la absorbancia a 412 nm durante 2 minutos a intervalos de 30 segundos. La actividad enzimática neta (actividad total registrada descontada la actividad del blanco) fue referida al contenido proteico de la muestra y los resultados se expresaron como nmoles de sustrato hidrolizado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ proteína⁻¹. Las determinaciones se realizaron por duplicado utilizando reactivos pro-análisis SIGMA.

4.3.2.2 Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)

Se realizó siguiendo la técnica de Baudhuin *et al.*, (1964). Sobre el sobrenadante obtenido a partir de los homogenatos con BHPM, se midió la actividad de la enzima utilizando alícuotas de 30 μl (para branquias) o 10 μl (para hígado) incubadas a 25°C con 1.5 ml de buffer fosfato NaH_2PO_4 0.05 M, pH 7.2. Luego se agregaron 9 μl H_2O_2 17.8 mM y seguidamente se registró la absorbancia en cubeta de cuarzo a 240 nm cada 10 segundos durante un minuto. La actividad se calculó como μmoles de H_2O_2 hidrolizado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

4.3.2.3 Glutación-S-transferasa (GST) (EC 2.5.1.18)

Se siguió el método propuesto por Habig *et al.*, (1974). La actividad de GST se midió sobre el sobrenadante obtenido con BHPM en alícuotas de 10 μl (incubadas a 25°C durante 2 minutos) con 1.1 ml de buffer fosfato NaH_2PO_4 0.1 M pH 6.5, 140 μl GSH 10 mM en agua mili-Q y 70 μl de CDNB (1-cloro-2-4-dinitrobenzoceno 20 mM en etanol absoluto) utilizado como sustrato. Luego la mezcla se homogenizó por inversión. Al minuto, se empezaron a

registrar los cambios en la absorbancia (340 nm en cubeta de cuarzo) por un período de 2 minutos a intervalos de 30 segundos.

La actividad enzimática neta (actividad total registrada descontada la actividad de blancos) fue referida al contenido proteico y los resultados se expresaron como $\mu\text{moles de CDNB conjugado formado. min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

4.3.2.4 Contenido de glutatión reducido (GSH)

La determinación se realizó mediante la técnica de Ellman (1959). Al sobrenadante obtenido con BHPM se lo acidificó con TCA (ácido tricloroacético) 10% en una relación 1:1 homogenato/TCA. Luego se centrifugó a 10000 g, a 4°C durante 10 minutos. De este nuevo homogenato ácido se utilizó el sobrenadante y el *pellet* se descartó. Se utilizaron 50-100 μl del sobrenadante completando el volumen final de 1,1 ml con TCA 5%, se agregó agitando en vortex 1 ml de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico 1.5 mM en buffer fosfato 0.25 M pH 8.0). Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y se leyó la absorbancia a 412 nm. El contenido de Glutatión se determinó comparando con una curva de calibración generada con GSH 0.1 mM en TCA 5%, con alícuotas de 10, 20, 40, 80 y 100 nmoles. Se determinó GSH como tioles ácido-solubles (TAS) y los resultados se expresaron como nmoles de TAS/g tejido.

4.3.2.5 Contenido de proteínas

Se evaluó mediante el método de Lowry *et al.*, (1951). Se incubaron 2-20 μl del homogenato (hígado o cerebro) en tubos conteniendo 1 ml del Reactivo C (50 ml Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N: 1 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5% en tartrato de Na 1%) y se llevó a volumen con agua mili-Q (volumen final 1200 μl), se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se agregó durante agitación en vortex 100 μl de reactivo de *Folin Ciocalteu* (Merck) diluido 1:1 con agua mili-Q y se incubó a temperatura ambiente

durante 30 minutos. Se leyó en espectrofotómetro a 750 nm. Se realizó una curva patrón con seroalbúmina bovina.

Las determinaciones de todas las actividades enzimáticas se realizaron por duplicado o triplicado, en un espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-Vis; los cálculos se realizaron con los valores promedios de las determinaciones.

Todos los reactivos utilizados en las técnicas mencionadas fueron de grado analítico.

5 Análisis de calidad de agua de las muestras ambientales

Las muestras del agua del Río Reconquista se tomaron aguas abajo de Represa Roggero (S 34°41'03.5" y W 58°51'15.5"). En la siguiente Figura (1.3.1) se muestra el sitio de localización de los muestreos:

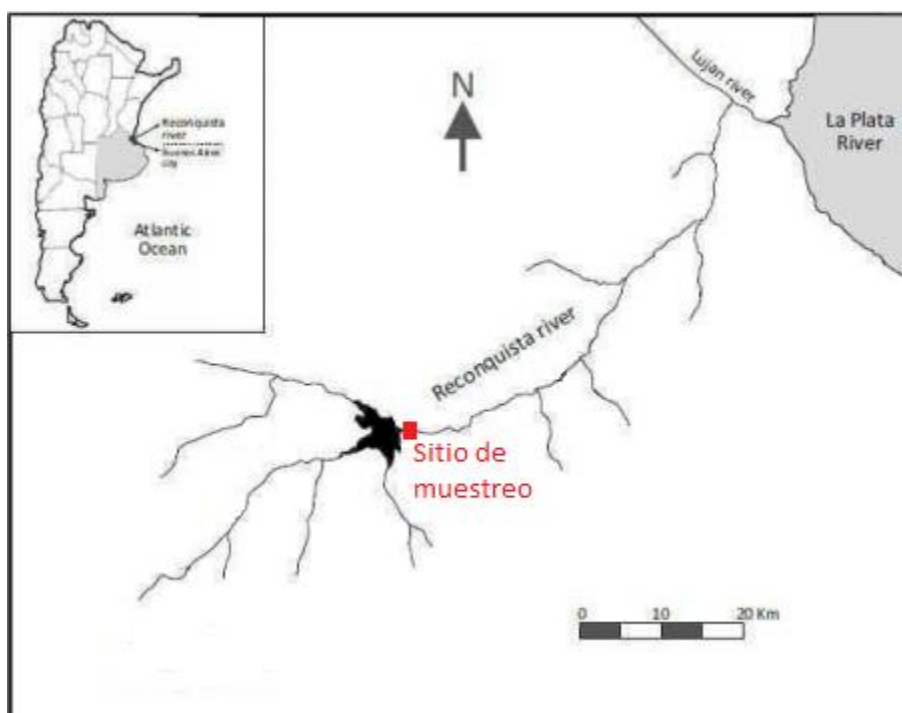


Figura 3.1: Sitio de muestreo del agua del río Reconquista utilizada en el experimento.

Las muestras ambientales provenientes del RR se realizaron en:

Primavera: 7 de noviembre de 2014.

Verano: 10 de febrero de 2017.

Otoño: 16 de mayo de 2016.

Invierno: 1 de julio de 2015

En estas muestras se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos:

Temperatura (°C), pH, conductividad (uS/cm), oxígeno disuelto (mg/l), alcalinidad (mg CaCO₃/l), dureza (mg/l), cloruros (mg Cl/l), amonio (mg N-NH₄/l), nitritos (mg N-NO₂/l), nitratos (mg N-NO₃/l), fosfatos ((mg P-PO₄/l), demanda biológica de oxígeno (DBO, mg O₂/l), demanda química de oxígeno (DQO, mg O₂/l), metales pesados y plaguicidas. En el Anexo 1, se detallan los métodos utilizados.

Las muestras necesarias para realizar los análisis fisicoquímicos, se recolectaron y guardaron en botellas de vidrio o plástico limpias, según el tipo de determinación.

Las muestras para la medición de los metales pesados, se recolectaron en recipientes plásticos de 100 ml acidificados hasta pH ≤ 2 con HNO₃.

Las muestras para medir plaguicidas fueron recolectadas en botellas de vidrio color caramelo de 1 litro. Luego, todas las muestras fueron conservadas a -20 °C y se midieron en: para Glifosato y AMPA, cromatografía líquida de alta resolución y espectrómetro de masa (HPLCMS) luego de derivatización con 9 fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC-CL) Modelo Agilent 1100. El cromatógrafo líquido se utilizó para la detección y cuantificación con fuente ESI ionizado operado en modo negativo, acoplado al Agilent model VL espectrómetro de masa (Agilent Technologies Inc., Miami, FL, USA), cromatógrafo separado con columna C18 X-SELECT™ usando metanol y agua miliQ en gradiente, con NH₄ como aditivo ionizador. Ambos cuantificados mediante curva de calibración; límite de detección 0.5 µg/l y de cuantificación 0.8 µg/l.

Otros plaguicidas fueron medidos utilizando cromatografía gaseosa (Agilent 6890N, equipada con inyector a 250 °C y columna de 30 m de HP-5, acoplada con captura de electrones y detectores selectivos de fósforo y nitrógeno, luego de una extracción líquida con diclorometano (APHA, 2005) y con Fluorisil (USEPASW-846, M 3620C). El límite de detección fue 0.1 y 0.001 µg/l y el de cuantificación fue 0.2 and 0.003 µg/l para atrazina y otros respectivamente.

6 índices químicos de la calidad del agua

A partir de la información fisicoquímica se determinó la calidad del agua mediante el cálculo de dos índices:

Los índices de calidad de agua (ICA) se calcularon a partir de las muestras de agua provenientes del sitio de muestreo de río Reconquista. Y fueron determinados a partir de dos índices locales que indican contaminación química, a partir de la base de parámetros fisicoquímicos seleccionados por su relevancia.

-El ICAB (Berón, 1984) es un índice de contaminación orgánica que integra varias variables fisicoquímicas a partir de un algoritmo ponderado que considera todas o algunas de esas variables. Este índice es determinado a partir de la temperatura, la concentración de cloruros, nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+), demanda biológica de oxígeno a 5 días (DBO_5) y oxígeno disuelto (OD), y varía entre 0 a 10, siendo que un índice igual a 0 corresponde a una muestra muy contaminada y uno igual a 10 corresponde a una muestra de agua prístina.

-Por otro lado, el ICAPI (índice de calidad de agua a partir de desechos industriales) (Lacoste & Collasius, 1995) es una expresión numérica de la contaminación presente en base a la concentración de desechos industriales como los fenoles, detergentes, metales pesados, OD, y demanda química de oxígeno (DQO). Los valores que toma este índice pueden variar en una escala de 0-10, donde el valor 0 del índice indica efluentes industriales sin tratamiento. Del mismo modo que para el ICAB, un valor del índice de 10 aplica a muestras de agua en estado de pureza original.

7 Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados de cada uno de los ensayos, así como para comparaciones inter-ensayos se realizó un ANOVA de un factor seguido de comparaciones múltiples de Tukey. Para aquellas variables que no cumplieron con el supuesto de

normalidad y homocedasticidad se aplicó análisis de Kruskal Wallis con comparaciones de a pares. Para el análisis de normalidad se utilizó el test de Shapiro Wilks modificado y el test de Levene para homocedasticidad.

La metodología estadística seguida, de acuerdo al paquete de datos particular considerado, se describe en los capítulos correspondientes.

Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico INFOSTAT versión 2018e (Di Rienzo, 2014); los gráficos se realizaron con el software para Windows Excel.

Sección II

Resultados

Consideración sobre esta sección

El orden en que se describen los resultados obtenidos en los bioensayos no necesariamente es el que se ha seguido en el desarrollo experimental de esta tesis, pero es el que mejor refleja su elaboración.

CAPÍTULO 4

Evaluación de la mortalidad en *Cnesterodon decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a agua del Río Reconquista y a Cadmio en concentración subtóxica

1 INTRODUCCIÓN

Durante la realización de los 4 ensayos estaciones que comprenden esta tesis (primavera, verano, otoño e invierno), la mortalidad fue contabilizada en cada réplica para cada uno de los tratamientos; esto es, para los grupos expuestos a las muestras ambientales del río Reconquista (RR), para los grupos expuestos al control positivo de Cadmio (Cd, concentración nominal 0.5 mg/l) y para el control negativo (MHW). Se propone así, abordar un primer e ineludible análisis en una evaluación ecotoxicológica. La mortalidad, como punto final representa la respuesta biológica irreversible, luego de que todos los procesos compensatorios desencadenados en situación de estrés fueran insuficientes. La evaluación de letalidad de un tóxico o sus mezclas, resulta necesaria para establecer rangos de tolerancia de la especie de ensayo en los diferentes medios experimentales, incluido el medio control y establecer concentraciones subtóxicas para el tóxico referente. Los daños que pueden evaluarse mediante la aplicación de diversos biomarcadores de efecto temprano, se presentan y discuten en los restantes capítulos de resultados.

Utilizando la mortalidad como punto final o *endpoint*, algunas de las cuestiones a indagar son:

¿El MHW, el cual es utilizado bajo normas protocolizadas y estandarizadas en juveniles de *Cnesterodon decemmaculatus*, es un buen control negativo?

¿Es el Cd en la concentración analítica utilizada un control positivo útil para evaluar letalidad sobre la especie?

Las muestras ambientales del río Reconquista para cada uno de los bioensayos realizados, ¿provocan sobre los organismos un efecto letal de consideración?

En el presente capítulo se analizarán los resultados obtenidos de la mortalidad acumulada a tiempo final de exposición para todos los tratamientos, teniendo en cuenta la estacionalidad y los medios de exposición utilizados.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO

Las hipótesis que se ponen a prueba son que, bajo condiciones controladas de laboratorio, animales adultos de *C. decemmaculatus* mantenidos en cautiverio y expuestos a los diferentes medios utilizados, durante 12 días:

- El MHW resulta un medio adecuado para su utilización como control negativo.
- El agua superficial del río Reconquista, con grado de polución leve no repercute sobre la supervivencia de los peces expuestos a ellas.
- El cadmio en una concentración de 0.50 mg/l puede establecerse como dosis sub-tóxica.

El objetivo es caracterizar el efecto letal de los diferentes medios de dilución durante cada ensayo estacional en la especie utilizada, sujeta a condiciones experimentales.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron todas las réplicas (N total=87) pertenecientes a los grupos control negativo - MHW (5 de primavera, 10 de verano, 13 de otoño y 7 de invierno. n=35), control positivo - Cd (5 de primavera, 9 de verano, 5 de otoño y 7 de invierno. n=26) y las de los grupos expuestos a las muestras ambientales pertenecientes al río Reconquista - RR (4 de primavera, 8 de verano, 8 de otoño y 6 de invierno. n=26). Los cuatro ensayos estacionales fueron de 12 días de permanencia en condiciones experimentales, previa aclimatación durante 7-14 días. La aclimatación se inició con agua dechlorada, utilizada como medio de cultivo, que gradualmente fue reemplazada por MHW. Los grupos utilizados estuvieron compuestos primordialmente por hembras de *C. decemmaculatus*: Para el ensayo de primavera se utilizaron 51 animales para el grupo MHW, 45 para el grupo Cd y 52 para el grupo RR (n del ensayo=138); para el ensayo de verano, 126 animales para el grupo MHW, 125 para el grupo Cd y 93 para el grupo RR (n del ensayo=344); para el ensayo de otoño, se utilizaron 168 animales para el grupo MHW, 57 para el grupo Cd y 106 para el grupo RR (n del ensayo=331); en el caso del ensayo de invierno, fueron 76 animales para el grupo MHW, 67 para el grupo Cd y 75 para el grupo RR (n del ensayo=208). N total experimento=1021 animales.

La variable analizada fue el porcentaje de mortalidad acumulada luego de 12 días de exposición a los diferentes medios de ensayo para cada tratamiento y ensayo.

El procedimiento experimental se encuentra detallado en el capítulo materiales y métodos, donde además se detallan los análisis físico-químicos correspondientes a las muestras ambientales, provenientes de la cabecera del río Reconquista. Se calcularon dos índices de calidad de agua: ICAP (Lacoste & Collasius, 1995) para indicar contaminación de tipo industrial, y el ICAB (Berón, 1984) para indicar contaminación de origen cloacal. El agua destinada a los ensayos se mantuvo en refrigeración y fue previamente filtrada para eliminar el exceso de material en suspensión.

Durante la exposición, se registraron de manera periódica el pH, la conductividad, el OD y la dureza de los diferentes medios.

Por último, se midió la concentración efectiva de las soluciones de Cd (concentración teórica 0.5 mg/l) utilizadas en cada uno de los 4 ensayos. Se asumió como concentración de exposición de cada ensayo a la media aritmética obtenida a partir de los registros realizados en las diferentes réplicas pertenecientes a este tratamiento.

Para las comparaciones realizadas entre controles en MHW respecto a los tratamientos Cd y RR intraensayos, se realizó un ANOVA de un factor seguido del test de Bonferroni. Para el análisis de normalidad se utilizó el test de Shapiro Wilks modificado y el test de Levene para homocedasticidad. Se utilizó el programa estadístico INFOSTAT versión 2018e (Di Rienzo *et al.*, 2014).

4 RESULTADOS

4.1 Calidad del agua proveniente de las nacientes del río Reconquista: características físicoquímicas de las muestras ambientales

A continuación, se presentan los parámetros físico-químicos analizados en las muestras provenientes del río Reconquista (34°41'03.5''S, 58°51'15.5''O) utilizada para los bioensayos. En la Tabla 4.1 se muestran tanto los parámetros medidos en campo el día del muestreo, así como aquellos que fueron medidos en el laboratorio dentro de las 24-48 h de realizado el mismo:

CAPÍTULO 4 RESULTADOS

Tabla 4.1: Parámetros físico-químicos e índices de calidad del agua de las muestras del agua superficial del río Reconquista.

Medido en campo	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO	Niveles guía
T H ₂ O °C:	19.5	24.3	12	13.4	≤45
T aire °C:	27.0	22.5	10.5	13.2	
pH	7.2	8.2	7.2	8.6	6.5-10
conductividad (μs/cm):	167	854	778	926	
OD (mg O ₂ /l) aire:	8.9	8.4	9.9	9.1	
OD (mg O ₂ /l) agua:	7.4	6.9	8.8	9.2	
Medidos en laboratorio					
DBO ₅ (mg O ₂ /l)	4	2.4	4.3	4.6	≤ 50
OD (mg O ₂ /l)	6	8.4	7.6	6.9	
cloruros (mg Cl/l)	6.5	26.5	37.5	50.8	
dureza (mg CaCO ₃ /l)	28	82	79	80	
alcalinidad (mg CaCO ₃ /l)	73	313	233	315	
DQO (mg O ₂ /l)	18	43	66.5	40	≤ 250
DQO/DBO ₅	4.5	19.7	15.5	8.7	
Turbidez (UNT)	93.5	231	91	157	
Amonio (mg N-NH ₄ /l)	0.08	0.07	0.07	0.07	0.05-0.47
Fosfatos (mg P-PO ₄ /l)	NM	0.64	NM	NM	
nitratos (mg/L N-NO ₃)	NM	NM	NM	3.14	
nitritos (mg/L N-NO ₂)	NM	NM	NM	0.09	
pH	7.2	8.2	7.2	8.6	
Metales pesados (μg/l)					
Hierro	NM	585 D	NM	NM	1370
Zinc	68 D	<100 D	NM	NM	11.03 -35.37
Niquel	NM	<100 D	NM	NM	7.25- 18.04
Cromo	2.2	7	2.0	<5 D	≤2.5
Plomo	<10 D	3 D	<1.0 ND	<10 D	1.59
Cadmio	<0.5 ND	<1 ND	<0.001 ND	<0.5 ND	0.028- 0.09
Cobre	83	50	NM	20	2.48-5.25
Arsénico	5.8	57	3.0	47	≤15
índices de calidad de agua					
ICAB ¹	8.8	8.6	8.8	8.6	
ICAPI ²	8.2	7.0	6.3	6.7	

NM: no medido; ND: no detectado; D: detectado. En negrita, metales pesados por encima de los niveles guía para la protección de biota acuática (Subsecretaría de recursos hídricos de la Nación). ¹Berón (1984); ² Lacoste & Collasius (1995).

Los resultados de las muestras ambientales confirman la baja polución de la zona de muestreo del río en comparación con otros sitios del mismo realizados a lo largo de su recorrido y estudiado por otros autores (Ossana, 2011, 2016; Rigacci, 2013). El pH fue

relativamente estable durante las diferentes estaciones climáticas, siendo levemente alcalino. El OD resultó siempre muy alto respecto a otras zonas hipóxicas del río aguas abajo (de la Torre, 2005). La conductividad, la dureza y la alcalinidad fueron similares para todos los muestreos, con excepción de la primavera debido a las intensas lluvias durante los días de la semana anterior al muestreo. Entre los indicadores de contaminación orgánica, el amonio (NH_4^+) la demanda biológica de oxígeno (DBO_5), la demanda química de oxígeno (DQO), siempre estuvieron por debajo de los niveles guía (Subsecretaría de recursos hídricos de la Nación). El fósforo reactivo soluble (PRS), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) cuando fueron determinados, así como los restantes indicadores de contaminación orgánica fueron bajos en comparación a las registradas históricamente aguas abajocuando el río atraviesa la localidad del Merlo ($34^\circ 39' 55'' \text{ S}$, $58^\circ 43' 39'' \text{ E}$), en el conurbano de la Pcia de Bs As (Castané *et al.*, 1998a,b; García *et al.*, 1998; Topalián *et al.*, 1999; Rovedatti *et al.*, 2001) y son coincidentes con los valores del reservorio de agua de la represa Roggero ($34^\circ 41' 03.5'' \text{ S}$, $58^\circ 51' 15.5'' \text{ O}$). La relación DQO/DBO_5 indicó que hubo contribución de materia orgánica no biodegradable durante las estaciones de verano y otoño donde los valores fueron aproximadamente el doble de los registrados para el caso de la primavera y el invierno. En el caso del ensayo de primavera, esta relación fue de 4.5, lo que indica que la materia orgánica sería moderadamente degradable. Entre los metales determinados, el Cu se encontró en valores muy superiores a los máximos permitidos (5.25 $\mu\text{g}/\text{l}$) en los tres muestreos en los que fue medido. En tanto que el As y el Cr se hallaron por encima de los niveles guía (15 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ respectivamente) en los muestreos de verano e invierno. Estos hallazgos concuerdan con los informados con anterioridad para la misma cuenca (Ferrari *et al.*, 2005; Ossana, 2011, 2016). Otros metales también fueron encontrados con frecuencia y en concentraciones elevadas superando los niveles guía (1.59, 1370 y 35.37 $\mu\text{g}/\text{l}$), como el caso del Pb, Fe y Zn. En la tabla 4.1 se indican en **negrita** aquellas mediciones de metales con valores mayores a los permitidos. Los niveles de pesticidas determinados se hallaron siempre por debajo del límite de detección de las técnicas (ver Anexo Capítulo 3).

Los índices de calidad del agua (tabla 4.1) toman valores de 1-10, donde un ICA 10 corresponde a un cuerpo de agua prístino mientras que uno de 0 a un cuerpo de agua con polución muy elevada. Para el ICAB, el valor de 0 corresponde a una descarga cloacal y doméstica, mientras que el 0 en ICAPI se corresponde a una descarga industrial. Los Índices de calidad de agua para las cuatro muestras de agua superficial del Río (ICA) oscilaron entre 8.6-8.8 (ICAB) y entre 6.3-8.2 (ICAPI). En todos nuestros muestreos, con excepción de la primavera donde el ICAPI indica un grado de pureza original (8.2), los restantes 3 valores obtenidos del ICAPI indicaron una calidad de agua con contaminación moderada (rango de 4-8), mientras que para el caso del ICAB, todos los valores obtenidos para las 4 estaciones indicaron una calidad de agua de pureza original (rango de 8-10).

Por último, cabe destacar que las precipitaciones ocurridas en la localidad de Moreno durante la semana previa a cada uno de los muestreos realizados en el río Reconquista, tuvieron un efecto de dilución. En particular para el caso de la primavera el nivel de precipitación fue de 152 mm, mientras que para el verano fue de 20 mm, 9 mm para el otoño y 17 mm para el muestreo de invierno.

4.2 Evaluación de parámetros físico-químicos medidos en las réplicas experimentales:

En la tabla 4.2 se muestran los resultados del grupo de parámetros físico-químicos de los medios de los bioensayos realizados en el laboratorio. Se puede apreciar que tanto la conductividad, como la dureza, el pH y el OD se mantuvieron estables durante todos los bioensayos para las 4 estaciones ensayadas. Los valores de pH obtenidos para las réplicas del tratamiento RR, son similares a los valores medidos en campo y a los datos de bibliografía pertenecientes al río Reconquista (Rigacci, 2013). Del mismo modo, la conductividad y la dureza se encontraron dentro del rango de los valores obtenidos en los muestreos al río. Para el caso de las réplicas de los grupos control MHW y del tratamiento Cd, los valores son similares entre sí y conciben con los valores pertenecientes a la formulación del agua moderadamente dura MHW.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS

Tabla 4.2: Parámetros físico-químicos de los medios de las réplicas durante los bioensayos medidos regularmente; media \pm DS, entre paréntesis número de mediciones. NM: no medido.

Ensayo	Tratamiento	Variables	Promedio \pm DS
Primavera	Cd	pH	7.38 \pm 0.12 (10)
		O ₂ (mg/ml)	7.49 \pm 0.39 (10)
		Conductividad (μ S/cm)	327.90 \pm 1.52 (10)
		Dureza (mg/L)	97.00 \pm 4.22 (10)
	MHW	pH	7.44 \pm 0.16 (9)
		O ₂ (mg/ml)	7.81 \pm 0.30 (9)
		Conductividad (μ S/cm)	316.89 \pm 10.56 (9)
		Dureza (mg/L)	93.33 \pm 4.33 (9)
	RR	pH	7.51 \pm 0.02 (4)
		O ₂ (mg/ml)	7.16 \pm 0.27 (4)
		Conductividad (μ S/cm)	214.93 \pm 3.80 (4)
		Dureza (mg/L)	26.25 \pm 3.80 (4)
Verano	Cd	pH	7.99 \pm 0.42 (48)
		O ₂ (mg/ml)	7.39 \pm 0.44 (58)
		Conductividad (μ S/cm)	344.49 \pm 6.34 (45)
		Dureza (mg/L)	95.20 \pm 8.44 (5)
	MHW	pH	8.11 \pm 0.39 (80)
		O ₂ (mg/ml)	7.20 \pm 0.51 (80)
		Conductividad (μ S/cm)	332.70 \pm 5.66 (80)
		Dureza (mg/L)	92.17 \pm 5.15 (12)
	RR	pH	8.25 \pm 0.19 (34)
		O ₂ (mg/ml)	6.88 \pm 0.61 (33)
		Conductividad (μ S/cm)	854.88 \pm 6.97 (34)
		Dureza (mg/L)	82.00 \pm 4.90 (6)
Otoño	Cd	pH	8.06 \pm 0.27 (30)
		O ₂ (mg/ml)	8.65 \pm 0.50 (30)
		Conductividad (μ S/cm)	328.68 \pm 2.01 (28)
		Dureza (mg/L)	94.00 \pm 2.83 (2)
	MHW	pH	8.33 \pm 0.27 (55)
		O ₂ (mg/ml)	8.82 \pm 0.30 (55)
		Conductividad (μ S/cm)	424.78 \pm 8.15 (55)
		Dureza (mg/L)	96.50 \pm 2.65 (12)
	RR	pH	8.16 \pm 0.18 (43)
		O ₂ (mg/ml)	8.78 \pm 0.33 (43)
		Conductividad (μ S/cm)	871.30 \pm 8.15 (43)
		Dureza (mg/L)	86.00 \pm 6.00 (3)
Invierno	Cd	pH	8.08 \pm 0.34 (34)
		O ₂ (mg/ml)	7.98 \pm 0.69 (34)
		Conductividad (μ S/cm)	NM
		Dureza (mg/L)	87.10 \pm 8.72 (16)
	MHW	pH	8.02 \pm 0.35 (37)
		O ₂ (mg/ml)	7.95 \pm 0.86 (37)
		Conductividad (μ S/cm)	NM
		Dureza (mg/L)	87.06 \pm 8.72 (16)
	RR	pH	8.46 \pm 0.46 (29)
		O ₂ (mg/ml)	7.89 \pm 0.85 (29)
		Conductividad (μ S/cm)	NM
		Dureza (mg/L)	NM

En la tabla 4.3 se muestran los resultados obtenidos de la concentración analítica de Cd medido cada 48 h o en cada renovación total del medio (cada 96 h) de las réplicas pertenecientes al tratamiento con Cd, así como también en peceras control (MHW) seleccionadas al azar, con el fin de verificar una posible contaminación cruzada. La concentración de Cd, se mantuvo estable en cada réplica durante todo el tiempo de exposición. Con excepción del bioensayo de primavera, donde la concentración efectiva del Cd fue de 0.46 mg/l, los demás bioensayos tuvieron una concentración efectiva que resultó en un rango de valores de 0.74-0.78 mg/l (promedio 0.68 mg/l). Las peceras control en MHW mostraron lecturas de Cd despreciables.

Tabla 4.3: Valores analíticos de Cd medidos cada 48-96 h en todas las réplicas pertenecientes al tratamiento, así como en réplicas control MHW. Se muestran las medias obtenidas, el desvío estándar (DS) y el número de mediciones (n).

Ensayo	Tratamiento	n	Media (mg/l)	D.S.
Primavera	Cd	62	0.46	4.0×10^{-3}
	MHW	39	9.7×10^{-4}	4.3×10^{-5}
Verano	Cd	60	0.78	2.4×10^{-2}
	MHW	11	0.03	2.0×10^{-2}
Otoño	Cd	67	0.74	1.1×10^{-2}
	MHW	21	0.01	2.0×10^{-2}
Invierno	Cd	58	0.76	8.0×10^{-2}
	MHW	35	0.08	9.0×10^{-2}

4.3 Mortalidad durante los bioensayos a 12 días de exposición

A continuación (Figura 4.1), se muestran los resultados obtenidos para la mortalidad acumulada (en porcentaje) a tiempo final de exposición obtenida en cada grupo experimental (control MHW, Cd 0.5 mg/l de MHW concentración teórica y muestras ambientales provenientes del río Reconquista) para los ensayos de primavera, verano, otoño e invierno.

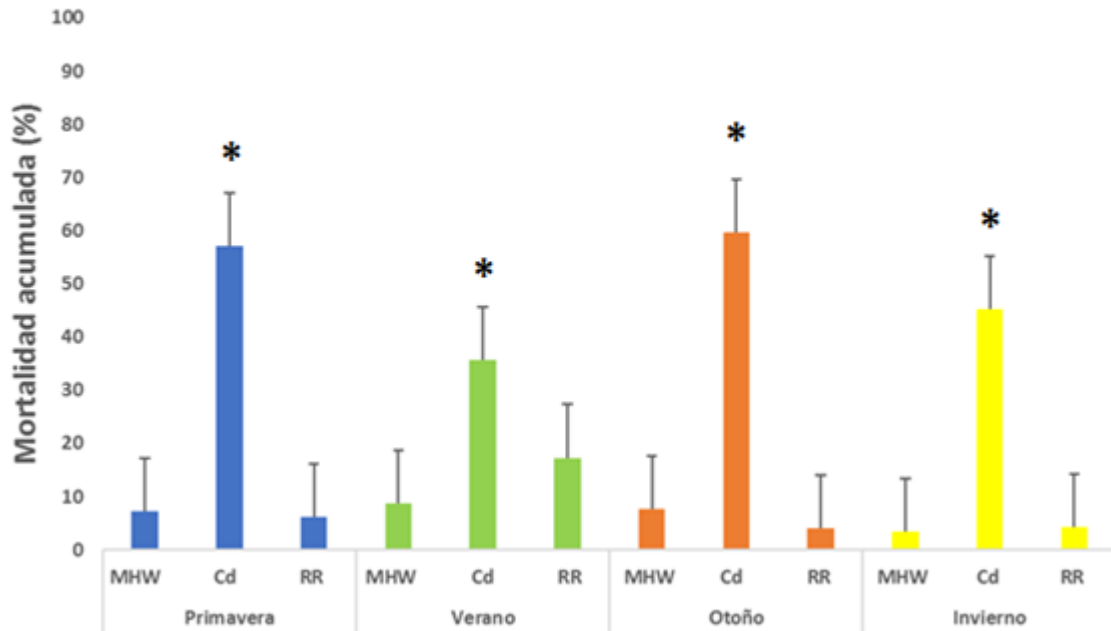


Gráfico 4.1: Mortalidad acumulada (%), expresada como media \pm ES, luego de 12 días de exposición para cada tratamiento y ensayo para *Cnesterodon decemmaculatus* (N mediciones= 86). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

MHW (control negativo); **Cd** (control positivo/tóxico referente): 0.46 a 0.78 mg/l MHW; **RR**: muestras ambientales provenientes del río Reconquista.

Al comparar dentro y entre cada uno de los ensayos realizados para cada tratamiento se desprende que los grupos del tratamiento Cd de los 4 bioensayos, tuvieron entre 5 y 8 veces más mortalidad acumulada, diferenciándose de manera estadísticamente significativa tanto del control MHW como del tratamiento RR. También puede observarse que en los grupos control MHW, así como en los grupos RR de todos los bioensayos, los resultados de mortalidad fueron similares entre sí, encontrándose en un rango de valores de porcentaje de entre 3.3 y 8.7, con excepción del grupo RR de verano que tuvo una mortalidad levemente superior. Los resultados obtenidos para los ejemplares expuestos al control MHW, están dentro de los esperables para un medio control, inferior al 10% de mortalidad. Por otra parte, respecto al efecto letal del Cd en las condiciones

experimentales se puede afirmar que para una concentración entre 0.47 y 0.78 mg/l la mortalidad esperable se encuentra en el rango de 36 a 60% aproximadamente.

5 DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó la mortalidad acumulada a 12 días de exposición para los diferentes medios utilizados durante los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno en adultos de *C. decemmaculatus*. Además, se evaluaron los parámetros físico-químicos de las muestras ambientales de cada uno de los muestreos realizados para cada una de las estaciones climáticas en las nacientes del río Reconquista.

Respecto a los resultados obtenidos para el análisis de los parámetros físico-químicos de las muestras ambientales (tabla 4.1), los valores obtenidos son concordantes con los registrados por otros estudios realizados en el río Reconquista para en el mismo sitio (Ossana, 2011, 2016; Rigacci, 2013). Las muestras tomadas en las nacientes del río Reconquista son similares a las estudiadas y obtenidas por Rigacci (2013) dentro del embalse Roggero, el cual estaría actuando como una laguna depuradora de las descargas orgánicas de la cuenca superior (Sadañowsky, 2003). Si bien los arroyos que forman la laguna San Francisco donde se encuentra el dique Roggero (La Horqueta, Durazno y Chozas) aportan diversa cantidad de contaminantes, las características físico-químicas son similares a la de la zona de muestreo, donde nace el río Reconquista, convirtiéndolo en la zona menos contaminada del mismo y pudiendo así, ser utilizada como punto de muestreo o como medio control o referente a contrastar respecto a zonas del río aguas abajo.

En función de los parámetros físico-químicos medidos, los valores hallados para todos los parámetros se encontraron siempre por debajo de aquellos informados para otras zonas del río Reconquista aguas abajo como en la localidad de Merlo (Ossana, 2011), concordantes con una zona de baja contaminación/calidad de pureza original que se refleja además en la calidad de sus aguas mediante la aplicación de los índices de calidad de

agua. Según el ICAP (Lacoste&Collasius, 1995) la calidad del agua es de contaminación leve o moderada, mientras que según el ICAB (Berón, 1984), los valores obtenidos indicaron una calidad de agua de pureza original.

Previamente al muestreo del ensayo de primavera, ocurrieron fuertes lluvias las cuales provocaron un efecto de dilución que se ve reflejado en los menores valores obtenidos durante ese ensayo para la dureza, los cloruros, conductividad, alcalinidad, DQO, DBO, DQO/DBO y turbidez en comparación a las demás estaciones, las cuales presentaron valores de estos parámetros muy similares entre sí (tabla 4.1). En cuanto al valor de NH_4^+ , se puede observar que aun con el efecto de la dilución causado por las lluvias, este valor se mantuvo constante y similar al resto. Las temperaturas del agua, fueron acordes con las épocas del año en que se efectuaron los muestreos. Este parámetro es importante dado que es determinante de las propiedades de numerosos componentes del medio que podrían intervenir en la calidad toxicológica de las muestras de los bioensayos (Ossana, 2011). No obstante, puesto que la temperatura de los ensayos fue similar para todos los tratamientos, el posible efecto de este parámetro resulta neutralizado. La misma autora (Ossana, 2011) obtuvo un 100 % de supervivencia en larvas pre-metamórficas de *Lithobates catesbeianus* en bioensayos también semi-estáticos de laboratorio por exposición de 96 h a muestras ambientales de agua provenientes de la zona de la represa, mientras que otros autores (de la Torre, 1997) utilizando a juveniles de *C. decemmaculatus* y exponiéndolos durante también 96 h a muestras provenientes del Reconquista (de las zonas Cascallares, a unos 4.6 Km de la cabecera del río) también obtuvieron al igual que en este trabajo, valores de mortalidad inferiores al 10% y similares a los obtenidos en los controles.

En cuanto a las mediciones físico-químicas realizadas sobre las réplicas de todos los tratamientos (tabla 4.2), los valores de conductividad, dureza y pH de las réplicas de los grupos RR fueron similares a las mediciones obtenidas sobre las muestras ambientales previamente a la realización de los bioensayos, confirmando que los medios de exposición fueron representativos del agua proveniente del río Reconquista, pudiendo extrapolar fehacientemente estos resultados obtenidos respecto a los que se podrían obtener en

estado natural bajo las mismas condiciones de los bioensayos. Por otro lado, los valores de estos mismos parámetros (conductividad, dureza y pH) en las réplicas de los grupos control MHW y del tratamiento Cd, también fueron similares entre sí. Cabe resaltar, que, si bien no se muestra en nuestros resultados, dentro de cada grupo, las réplicas de cada medio de exposición tuvieron valores similares entre cada una de ellas, tornándolas comparables entre sí sin afectar los resultados obtenidos.

La calidad del agua utilizada para bioensayos, así como el agua de dilución necesaria para preparar medios controles, positivos y negativos, es extremadamente importante y debe provenir siempre de la misma fuente en ambos casos (US EPA, 1993). El medio control negativo utilizado fue agua reconstituida moderadamente dura (MHW), medio ya estandarizado y protocolizado para bioensayos con esta especie (Mastrángelo & Ferrari, 2013), utilizándose como medio control en exposición a 12 días por primera vez para esta tesis. En nuestros resultados, en relación a este medio, no se observó ningún efecto adverso de consideración durante todos los bioensayos, obteniéndose mortalidades dentro de los valores permitidos para un medio control en la realización de bioensayos (menores al 10 %), si bien debe destacarse que los animales requieren un tiempo relativamente prolongado de aclimatación. Todos los valores de mortalidad de las réplicas del grupo MHW de los 4 bioensayos, fueron similares y comparables entre sí durante todas las estaciones ensayadas (Figura 4.1). Menéndez-Helman (2015) utilizó el mismo medio de exposición como control también en *C. decemmaculatus*, sin reportar información acerca de la mortalidad, pero mostrando resultados confiables de su uso como control negativo; la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, 1993) propone al MHW como uno de los medios para control negativo para bioensayos, utilizándose en ensayos de medición de la toxicidad aguda de aguas receptoras y efluentes para organismos marinos y de agua dulce. Giusto *et al.* (2014), reportaron información con la utilización de MHW en experimentos de exposición a 10 días en *Hyallela curvispina*. Según nuestros resultados, podemos afirmar que, al no haber una mortalidad superior a la permitida en nuestros bioensayos, el MHW como medio control fue aceptable para ser implementado en adultos de *C. decemmaculatus* en ensayos de

exposición a mediano término. No obstante, de la observación durante los ensayos y el manipuleo experimental debe ser tenido en consideración, que la aclimatación al MHW debe ser realizada cuidadosamente para evitar mortalidad inicial.

Los animales utilizados en los ensayos provinieron de criadero, con condiciones ambientales estandarizadas y controladas, de buen estado de salud, por lo que se encontraban libres de exposición a contaminantes previamente a la realización de los bioensayos. Así, la mortalidad registrada es a causa de la exposición a los medios de experimentación utilizados.

Los diferentes ambientes acuáticos naturales, suele estar contaminados con xenobióticos como el caso de los metales pesados, que, por su persistencia y su capacidad de bioacumulación, en concentraciones suficientemente altas pueden ser tóxicos para todos los organismos que habitan ambientes acuáticos, así como para el ser humano (Eissa, 2009). El Cd es un elemento asociado a numerosos efectos deletéreos para los peces y ha demostrado ser un buen control positivo en bioensayos con este tipo de organismo (Ferrari, 2011; Ossana, 2011; Mastrángelo & Ferrari, 2013). Este elemento, para producir un efecto letal debe primeramente ingresar al organismo y luego alcanzar el sitio blanco de acción en concentraciones internas letales, causando la muerte del organismo independientemente de las concentraciones externas del contaminante (Penttinen *et al.*, 2011). En nuestros ensayos los valores de mortalidad acumulada promedio fueron del 45 % (figura 4.1). Teniendo en cuenta que la concentración final analítica promedio de Cd de los 4 ensayos fue de 0.68 mg Cd/l MHW (tabla 1.4), podríamos asumir que la CL 50-12 días es menor a 1mg/l y se encuentra en el rango de las concentraciones ensayadas: 0.46 a 0.78 mg Cd/l. La variabilidad de respuesta entre ensayos no debería ser asumida solo como efecto de la concentración del Cd sino también deben considerarse otras variables, como talla y peso de los animales expuestos, puesto que los efectos tóxicos del Cd muestran una gran variabilidad incluso dentro de ejemplares de la misma especie y estadio de desarrollo (Mebane, 2006; Achiorno *et al.*, 2010). Es importante señalar que en la literatura existen valores extremadamente variables para la CL 50 del Cd con peces, de diferentes ordenes de magnitud para una misma especie, y ello sin considerar las

condiciones determinantes de la toxicidad como son el sexo, la edad, etc. (US EPA, 1985). Mediante la realización de una carta control, Mastrángelo & Ferrari (2013) determinaron las CL 50 a 24 y 48 h en ejemplares juveniles de *C. decemmaculatus* utilizando Cd como tóxico de referencia, obteniendo resultados de 6.0 y 2.3 mg Cd/l de MHW, respectivamente. En otros bioensayos realizados con juveniles de la carpa común (*C. carpio*) se obtuvo una CL 50 de 1.6 mg Cd/l agua potable luego de 12 días de exposición (de la Torre *et al.*, 2000). Considerando que nuestros ensayos fueron prolongados y con animales adultos, los valores obtenidos parecen ser concordantes con los referidos en la bibliografía.

La sola utilización de un punto final como es la letalidad enmascararía el efecto estresante que los medios de exposición pueden generar sobre los organismos de ensayo, desestimando información relevante y necesaria para la adecuada caracterización de daño debido al efecto temprano por exposición sobre *C. decemmaculatus*.

6 CONCLUSIONES

- El medio control negativo MHW presentó una mortalidad por debajo del 10 %, pudiendo ser considerado como medio control válido.
- La mortalidad acumulada luego de 12 días de exposición fue significativamente alta, alcanzando hasta un 60% en los grupos expuestos al Cd, demostrando su utilidad como tóxico referente para utilizar en adultos de ambos sexos de *C. decemmaculatus*.
- La mortalidad obtenida en las muestras ambientales del río, fue similar para los cuatro ensayos, siendo inferior al 10%, con excepción del bioensayo de verano, que presentó un 17 % de mortandad.
- Las muestras provenientes de los cuatro bioensayos con agua del río Reconquista, presentaron valores con menores diferencias en la composición físico- química, pudiendo ser caracterizada como de contaminación moderada según el ICABI y de pureza original según el ICAB.

CAPÍTULO 5

Propuesta de líneas de base de biomarcadores en animales control experimental de laboratorio.

1 INTRODUCCIÓN

Al inicio de este estudio en relación con la especie de ensayo, *C. decemmaculatus*, se contaba con información variada tanto respecto a su biología como su respuesta a distintos tóxicos. Sin embargo, y a pesar de que se ha utilizado a las madrecitas como organismo prueba desde hace ya mucho tiempo, se carecía hasta el momento de rangos de valores de referencia o, dicho de otro modo, “normales” de los distintos parámetros biológicos propuestos como biomarcadores de efecto o exposición.

Por otra parte, la categoría o establecimiento del control de un ensayo es variable y dependiente, en buena medida, del contexto del estudio (ie. campo o laboratorio). En particular, en ensayos de laboratorio el grupo control debe provenir de la misma cohorte que los grupos experimentales, permitiendo así validar la posibilidad de contrastar los efectos en animales experimentales frente a los controles. Si bien para la experimentación es una condición necesaria contar con cohortes en buen estado de salud y libres de exposición previa a contaminantes, en general, además de parámetros básicos como mortalidad e índices biométricos, es poca la atención que se ha prestado al estado de salud general y condición fisiológica de los animales. Sin embargo, es un hecho claramente establecido que la respuesta de los animales a situaciones de estrés experimental depende de su capacidad de respuesta homeostática (o adaptación) que es resultante de su “estado fisiológico”, y esto es crítico especialmente en la evaluación de respuestas de efecto temprano. Cabe preguntarse:

¿De qué manera el estrés experimental repercute sobre los animales control?

¿Es posible establecer una línea de base o “carta control” para cada biomarcador empleado?

¿Existe variabilidad estacional de los diferentes puntos finales evaluados, aún en condiciones estables de cautiverio?

En esta tesis se realizaron los primeros ensayos integrando aspectos de índole ecofisiológica y ecotoxicológica en *C. decemmaculatus*. En el presente capítulo se analizarán los resultados obtenidos en los controles de los distintos ensayos estacionales a fin de aportar información que permita dar algunas respuestas a las preguntas anteriores.

La importancia de contar con valores de algunas de las variables biológicas para iniciar una línea de base control aportará información clave sobre la biología de *C. decemmaculatus* y su utilización como especie modelo en bioensayos ecotoxicológicos de efecto temprano.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO

La hipótesis que se pone a prueba es que: bajo condiciones controladas de laboratorio, adultos de *C. decemmaculatus* mantenidos en cautiverio no muestran variabilidad estacional de los biomarcadores evaluados.

El objetivo es establecer el rango de variabilidad anual de los valores basales de los parámetros biológicos estudiados en la especie de ensayo sujeta a condiciones experimentales.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Según los grupos de ejemplares (provenientes de los cultivos *indoor*) pertenecientes a MHW (de los cuatro bioensayos) destinados exclusivamente para las mediciones de los biomarcadores y la obtención de la línea de base, luego de 12 días de permanencia en condiciones experimentales, los grupos utilizados están compuestos por 10 machos y 9 hembras (ensayo de primavera'14); 15 hembras y 3 machos (ensayo de Verano'17); 21 hembras y 1 macho (ensayo de Otoño'16) y 14 hembras y 1 macho (ensayo de Invierno'15); N = 74 animales.

Las variables que se analizaron fueron agrupadas en las siguientes categorías:

- 1) Biométricas (peso corporal, talla, Factor de Condición - FC e índice Hepato-somático - IHS): Con excepción del ensayo de primavera, también se calculó el Índice Gónado-somático en hembras - IGS.
- 2) Metabólicas: Ingesta (I), heces (H) y asimilación específica (A); Tasa metabólica específica (TME); Eficiencia de extracción de oxígeno (EEO%); Excreción de amonio (E); Cociente de amonio (CA); Campo de Crecimiento o *Scope For Growth* (SFG).
- 3) Bioquímicas: actividad de la Acetilcolinesterasa -AChE, Catalasa - CAT, Glutation S-Transferasa -GST y contenido de Glutati6n reducido - GSH.

Para el análisis de los resultados para cada uno de los ensayos, así como comparaciones inter-ensayos se aplicó el test de Shapiro Wilks modificado y el test de Levene para confirmar normalidad y homocedasticidad. En caso de que los datos cumplieran con estos supuestos, se aplicó ANOVA de un factor seguido de comparaciones múltiples de Tukey. Para aquellas variables que no cumplieron con el supuesto de normalidad y homocedasticidad se aplicó análisis de Kruskal Wallis con comparaciones de a pares. Para cada una de las variables biológicas, tomando al total de población de datos se aplicó análisis de frecuencias y ajustes de funciones de distribución teóricas sobre distribuciones

empíricas. Se utilizó el programa estadístico INFOSTAT versión 2018e (Di Rienzo *et al.*, 2014).

4 RESULTADOS

4.1 Variables Biométricas

En la Tabla 5.1 se muestran los parámetros estadísticos descriptivos básicos para Talla, Peso corporal, Factor de Condición (FC) e índice Hepato-somático (IHS) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional y para el total luego de 12 días de exposición a medio control -MHW.

En relación con la talla, con excepción del grupo de verano, significativamente menor respecto al de invierno, las tallas son semejantes entre estaciones (ANOVA con comparaciones de Tukey). Al igual que para la talla, con excepción del grupo de verano, significativamente menor respecto al grupo de invierno, los pesos corporales medios entre grupos son semejantes (análisis de Kruskal Wallis con comparaciones de a pares).

Respecto al Factor de condición (FC) no se encontraron diferencias significativas entre estaciones (ANOVA con comparaciones de Tukey). En consideración de la ecuación de cálculo de este índice y en vista de los resultados obtenidos para talla y peso, es esperable que el FC no difiera entre grupos. Estos resultados permiten afirmar que biométricamente todos los grupos son semejantes y por ende comparables entre sí, aun considerando las diferencias existentes entre pesos y tallas nombradas más arriba.

En relación con el índice Hepato-somático (IHS) no se encontraron diferencias significativas entre las estaciones, los valores son bastante homogéneos entre grupos. (ANOVA con comparaciones de Tukey).

El Índice Gónado-somático de hembras (IGS) se calculó solo para verano, otoño e invierno. En la Tabla 5.2 se muestran los valores registrados para IGS y peso de ovarios tanto por ensayo como para el total de ensayos. No se observaron diferencias significativas respecto a peso de ovario e IGS entre las estaciones, (Kruskal Wallis con

comparaciones de a pares) y existe una muy importante variabilidad dentro de cada grupo. No obstante, se debe considerar una tendencia a mayores pesos de ovarios durante el verano respecto a los otros dos grupos. Estos resultados son esperables de acuerdo a la estrategia reproductiva de la especie, que incluye superfetación y gestación intra-folicular, por lo cual se pueden hallar hembras preñadas a lo largo de todo el año y ovarios en diferentes estados madurativos.

Tabla 5.1: Se muestran los valores estadísticos descriptivos básicos [Talla, Peso corporal, Factor de Condición (FC) e índice hepato-somático (IHS)] de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional y para el total de datos luego de 12 días de exposición a medio control -MHW. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$)

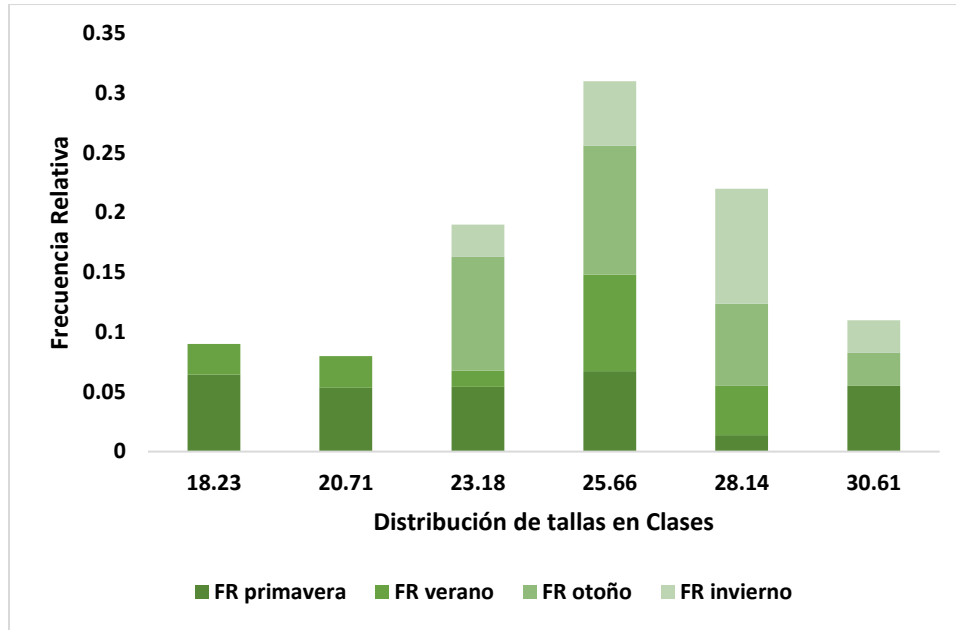
Medida	Estación	Talla (mm)	peso (mg)	FC	IHS
N		19	19	19	19
Media		24,55 ^{a, b}	101,12 ^{a, b}	0,64 ^a	1,59 ^a
D.E.	primavera	4,3	47,1	0,13	0,87
E.E.		0,99	10,81	0,03	0,2
CV		17,51	46,58	20,32	54,98
N		18	18	18	18
Media		23,05 ^{b, c}	96,97 ^{b, c}	0,73 ^a	1,55 ^a
D.E.	verano	3,91	47,19	0,19	0,84
E.E.		0,92	11,12	0,05	0,2
CV		16,96	48,67	26,14	54,05
N		22	22	22	22
Media		25,75 ^{a, b}	125,98 ^{a, b}	0,73 ^a	1,69 ^a
D.E.	otoño	2,29	33,52	0,09	0,64
E.E.		0,49	7,15	0,02	0,14
CV		8,9	26,61	12,29	37,87
N		15	15	15	15
Media		27,31 ^a	135,88 ^a	0,66 ^a	1,22 ^a
D.E.	invierno	2,15	33,38	0,1	0,55
E.E.		0,56	8,62	0,03	0,14
CV		7,88	24,56	14,98	44,7
N		74	74	74	74
Media		25,1	114,55	0,69	1,53
D.E.	Total	3,57	43,11	0,14	0,74
E.E.		0,42	5,01	0,02	0,09
CV		14,23	37,64	19,66	48,55

Tabla 5.2: Índice Gónado-somático de hembras - IGS y peso de ovarios (mg) de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control - MHW. Se muestran los valores estadísticos descriptivos básicos para cada ensayo y para el total de datos.

Estación	Parámetro	media	DE	EE	CV
Verano (11)	IGS	1	0,99	0,3	99,04
	ovarios (mg)	1,23	1,55	0,47	125,49
Otoño (20)	IGS	0,66	0,25	0,06	38,15
	ovarios (mg)	0,88	0,47	0,11	54,05
Invierno (14)	IGS	0,75	0,34	0,09	45,08
	ovarios (mg)	1,04	0,39	0,1	37,35
Total (45)	IGS	0,77	0,55	0,08	71,18
	ovarios (mg)	1,02	0,84	0,13	82,8

En función del análisis de resultados biométricos por ensayo y a pesar de la dispersión de los datos, se puede inferir que no existirían evidencias suficientes para considerar estacionalidad para los mismos. Así, con la finalidad de establecer rangos de valores esperables, se realizaron análisis de frecuencia para cada parámetro biométrico tomando el total de datos.

En la Figura 5.1 se muestra el gráfico de distribución de tallas en clases y la tabla de mejor modelo de ajuste de distribución



Ajuste: Normal con estimación de parámetros: Media= 25,1 y varianza= 12,7

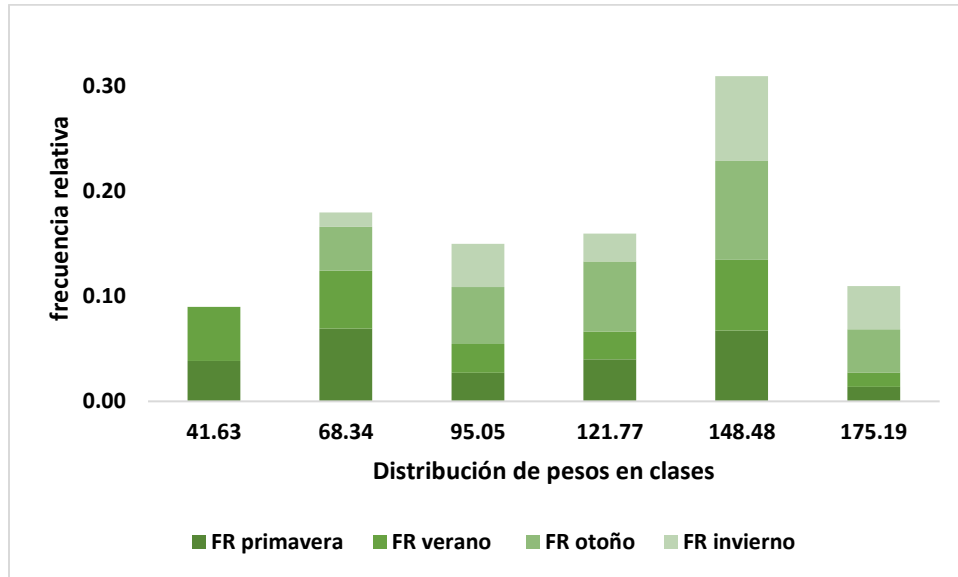
Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	16,99	19,47	18,23	7	0,09	4,25	0,06	1,79	
2	19,47	21,94	20,71	6	0,08	9,7	0,13	3,2	
3	21,94	24,42	23,18	14	0,19	17,47	0,24	3,89	
4	24,42	26,90	25,66	23	0,31	19,84	0,27	4,39	
5	26,90	29,37	28,14	16	0,22	14,18	0,19	4,63	
6	29,37	31,85	30,61	8	0,11	8,56	0,12	4,66	0,1983

Figura 5.1: Análisis de frecuencia para talla de los grupos control de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno (N = 74). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

El análisis de frecuencia sobre el total de registros para talla, de los cuatro ensayos da como resultado 6 clases con un ajuste de distribución normal. El rango de longitud del total de datos es entre 17 y 32 mm aproximadamente, de las cuales aproximadamente el 70 % de los datos se distribuyen en las clases 3 a 5 con longitudes entre 22 y 30 mm. En las clases 1 y 2 solo se encuentran ejemplares de los ensayos de primavera y verano y a partir de la clase 3 se incorporan ejemplares de otoño e invierno (ver anexo). En resumen, en las

condiciones experimentales, la longitud resulta un parámetro de escasa variabilidad a lo largo del año.

En la Figura 5.2 se muestra el gráfico de distribución de pesos corporales en clases y la tabla de mejor modelo de ajuste de distribución.



Ajuste: Normal con estimación de parámetros: Media= 114,5 y varianza= 1858,5

Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	28,27	54,98	41,63	7	0,09	6,18	0,08	0,11	
2	54,98	81,70	68,34	13	0,18	10,32	0,14	0,8	
3	81,70	108,41	95,05	11	0,15	16,31	0,22	2,53	
4	108,41	135,12	121,77	12	0,16	17,76	0,24	4,4	
5	135,12	161,84	148,48	23	0,31	13,34	0,18	11,4	
6	161,84	188,55	175,19	8	0,11	10,09	0,14	11,83	0,008

Figura 5.2: Análisis de frecuencia para pesos corporales de los grupos control de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno (N = 74). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

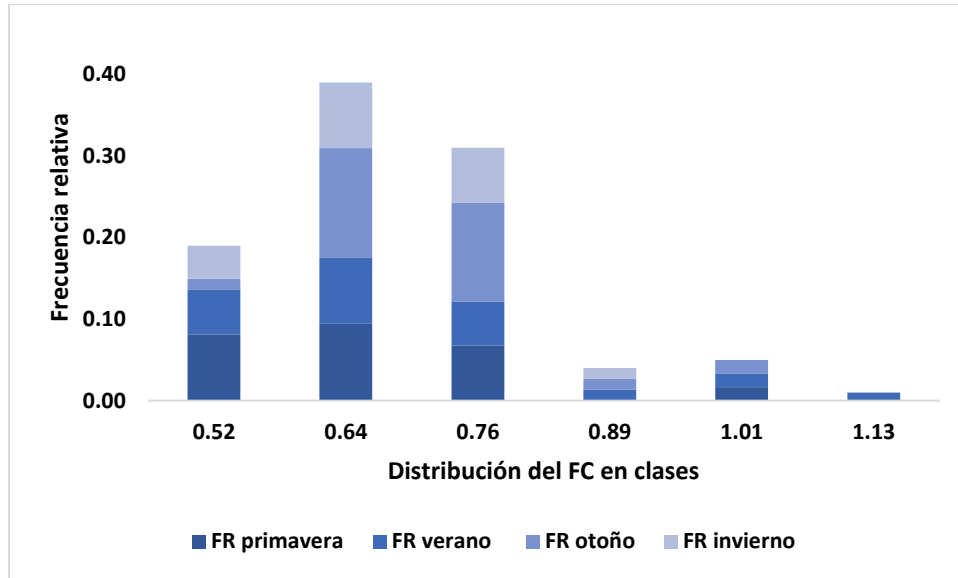
El análisis de frecuencia de pesos corporales sobre el total de registros de los cuatro ensayos da como resultado 6 clases con un ajuste de distribución normal. El rango de pesos del total de datos es entre 28 y 188 mg aproximadamente, con un pico importante

para la clase 5, que representa el 30% del total en un rango entre 135 y 162 mg. Con excepción de la clase 1, solo integrada por ejemplares de primavera y verano, las restantes clases se integran de manera equitativa por ejemplares de los cuatro ensayos (ver anexo).

En resumen, el peso corporal, muestra una mayor variabilidad que la longitud tanto dentro como entre grupos, pero no existe evidencia de variación estacional. Se concluye así que el rango esperable de peso corporal para ejemplares adultos de *C. decemmaculatus* en condiciones control experimentales es de 28 a 185 mg.

En la Figura 5.3 se muestra el gráfico de distribución de Factor de Condición (FC) en clases y la tabla de mejor modelo de ajuste de distribución.

El análisis de frecuencia de FC sobre el total de registros de los cuatro ensayos da como resultado 6 clases con un ajuste de distribución Gama (Figura 5.3). El rango de FC del total de datos es entre 0.46 y 1.19, con una mayor proporción entre las clases 2 y 3, que representa el 70% del total en un rango entre 0.58 y 0.83. Con excepción de la clase 6, solo integrada por 2 ejemplares de verano, las restantes clases se integran de manera equitativa por ejemplares de los cuatro ensayos (ver anexo). Por lo tanto, se concluye que para adultos de *C. decemmaculatus* en condiciones de control experimental es esperable que tengan valores de FC mayoritariamente en un rango de 0.58 a 0.83 independientemente de la estación climática.

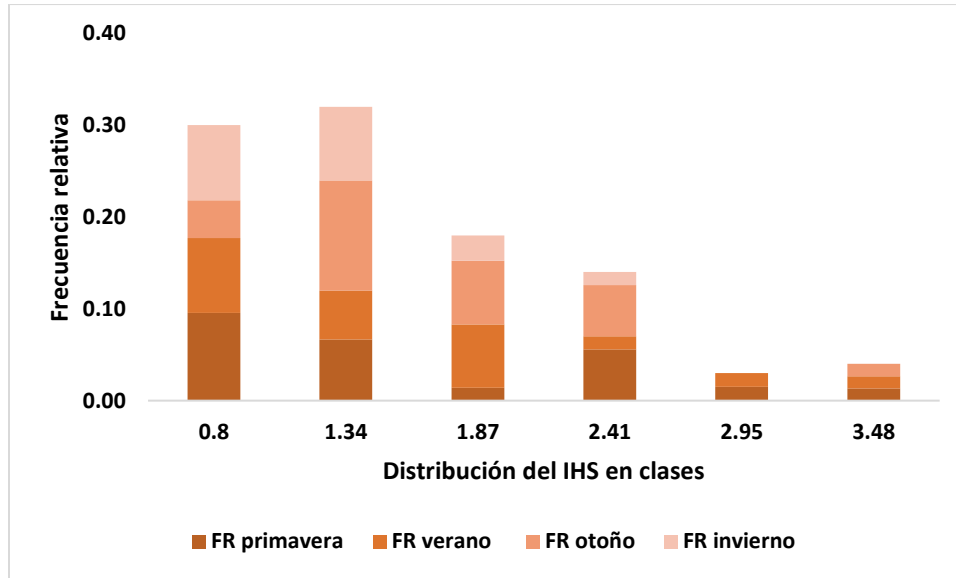


Ajuste: Gama con estimación de parámetros: Lambda= 40,9 y r= 28,4

Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	0,46	0,58	0,52	14	0,19	14,81	0,2	0,04	
2	0,58	0,70	0,64	29	0,39	26,42	0,36	0,3	
3	0,70	0,83	0,76	23	0,31	21,39	0,29	0,42	
4	0,83	0,95	0,89	3	0,04	8,81	0,12	4,25	
5	0,95	1,07	1,01	4	0,05	2,16	0,03	5,83	
6	1,07	1,19	1,13	1	0,01	0,4	0,01	6,71	0,0816

Figura 5.3: Análisis de frecuencia para Factor de condición (FC) de los grupos controle de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno (N=74). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

En la Figura 5.4 se muestra el gráfico de distribución de Índice Hepato-Somático (IHS) en clases y la tabla de mejor modelo de ajuste de distribución.



Ajuste: Gama con estimación de parámetros: Lambda= 2,9 y r= 4,5

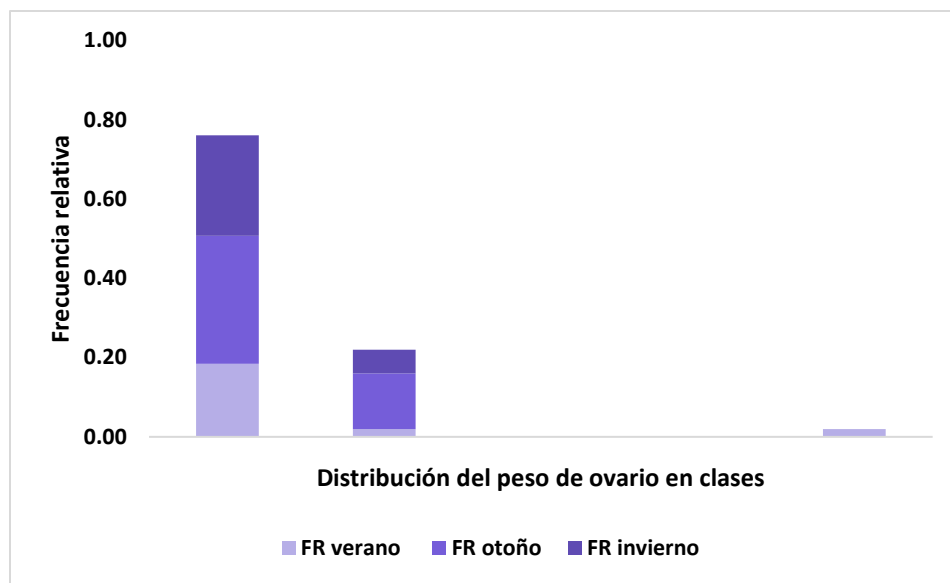
Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	p
1	0,53	1,07	0,8	22	0,3	21,11	0,29	0,04	
2	1,07	1,60	1,34	24	0,32	23,21	0,31	0,06	
3	1,60	2,14	1,87	13	0,18	16,08	0,22	0,65	
4	2,14	2,68	2,41	10	0,14	8,18	0,11	1,06	
5	2,68	3,21	2,95	2	0,03	3,46	0,05	1,68	
6	3,21	3,75	3,48	3	0,04	1,95	0,03	2,24	0,5237

Figura 5.4: Análisis de frecuencia para Índice Hepato-somático (IHS) de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno (N = 74). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. Se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

El análisis de frecuencia de IHS sobre el total de registros de los cuatro ensayos da como resultado 6 clases con un ajuste de distribución Gama (Figura 5.4). El rango de IHS del total de datos es entre 0.53 y 3.75, con una mayor proporción entre las tres primeras clases que representan el 80% del total en un rango entre 0.53 y 2.14. El rango de valores

que se incluyen en las clases 5 y 6, entre 2.68 y 3.75, se componen por 5 de los 74 datos (pertenecientes a los ensayos de primavera, verano y otoño) y representan el 7% del total, motivo por el que claramente se trata de valores excepcionales. Por otra parte, las clases se integran de manera equitativa por ejemplares de los cuatro ensayos (ver anexo). Estos resultados permiten afirmar que, en condiciones de control experimental, el IHS es un parámetro que no muestra variaciones a lo largo del año y que el mismo se encuentra mayoritariamente entre 0.53 y 2.14.

En la Figura 5.5 se muestra el gráfico de distribución de pesos ováricos en clases y la tabla de mejor modelo de ajuste de distribución.



Ajuste: Poisson con estimación de parámetros: lambda= 1,01

Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	p
1	0,24	1,3	0,77	34	0,76	32,85	0,73	0,04	
2	1,3	2,36	1,83	10	0,22	8,41	0,19	0,34	
3	2,36	3,43	2,9	0	0	2,85	0,06	3,19	
4	3,43	4,49	3,96	0	0	0,72	0,02	3,91	
5	4,49	5,55	5,02	1	0,02	0,18	3,90E-03	7,77	0,0509

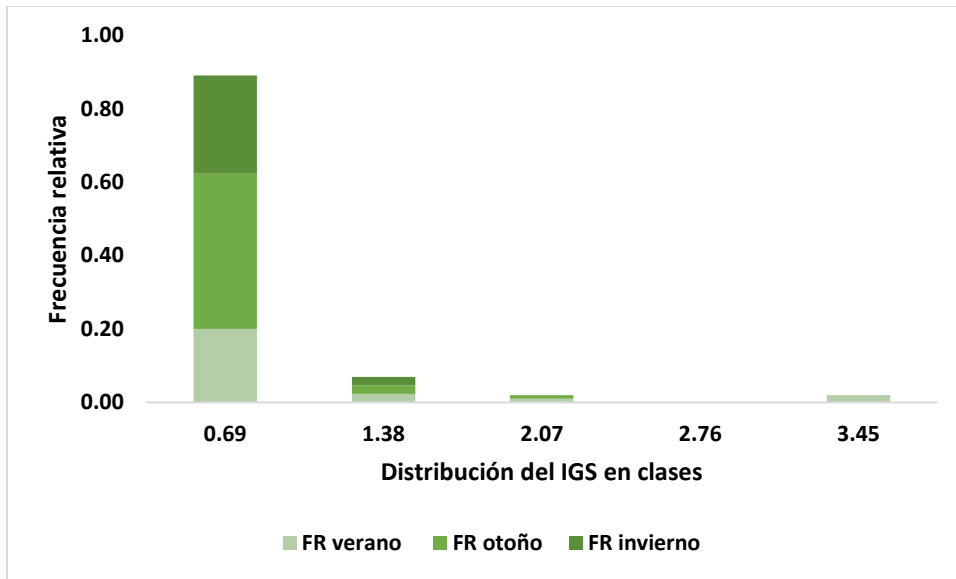
Figura 5.5: Análisis de frecuencia para peso de ovarios de los grupos control de los bioensayos de verano, otoño e invierno (N = 45). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

El análisis de frecuencia para peso de ovarios sobre el total de registros de los tres ensayos considerados (verano, otoño e invierno) da como resultado 5 clases con un ajuste de distribución del tipo Poisson (Figura 5.5). El rango de pesos de ovarios del total de datos es entre 0.24 y 5.55 mg, pero considerando que las clases 1 y 2 están integradas por 44 de los 45 datos (98 % de los datos), se puede concluir que el rango esperable de valores de ovarios es de entre 0.24 y 2.36 mg. La clase 1 está integrada en un 24, 42 y 33% aproximadamente y la clase 2 en un 9, 63 y 27 % aproximadamente por ejemplares de verano, otoño e invierno respectivamente. Las clases 3 y 4 no presentan datos, mientras que la clase 5 se compone de un solo ejemplar de verano (ver anexo). Queda evidenciado así, bajo las condiciones de estudio, ausencia de estacionalidad en la masa ovárica.

En la Figura 5.6 se muestra el gráfico de distribución de Índice Gónado-somático de las hembras (IGS) en clases y la tabla de mejor modelo de ajuste de distribución. El análisis de frecuencia de IGS sobre el total de registros de los tres ensayos considerados (verano, otoño e invierno) da como resultado 5 clases con un ajuste de distribución Gama. El rango de IGS del total de datos es entre 0.35 y 3.79, pero con una muy clara preponderancia de la clase 1, que representa el 89% del total en un rango entre 0.35 y 1.04. El rango de valores que se incluyen en las clases restantes, con un rango entre 1.04 y 3.79, se componen por 5 de los 45 datos y representan el 11% del total, motivo por el que se asumen como valores excepcionales. Por otra parte, las clases 1 se compone en una

proporción de 47% de ejemplares del ensayo de otoño, 30% del de invierno y 22% de ensayo de verano (ver anexo).

Estos resultados permiten afirmar que en condiciones de control experimental el IGS es un parámetro que no muestra variaciones entre las estaciones climáticas analizadas siendo esperable que se encuentre comprendido en valores dentro del rango de 0.35 a 1.04.



Ajuste: Poisson con estimación de parámetros: Lambda= 0,77

Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	p
1	0,35	1,04	0,69	40	0,89	36,85	0,82	0,27	
2	1,04	1,73	1,38	3	0,07	0	0	0,27	
3	1,73	2,41	2,07	1	0,02	6,19	0,14	4,62	
4	2,41	3,10	2,76	0	0	1,59	0,04	6,21	
5	3,10	3,79	3,45	1	0,02	0,36	0,01	7,34	0,0617

Figura 5.6: Análisis de frecuencia para Índice Gónado-somático (IGS) de los grupos controles de los bioensayos de verano, otoño e invierno (N = 45). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

4.2 Variables del Metabolismo Energético

Para la evaluación del metabolismo energético se consideran variables de comportamiento y eficiencia alimentaria, de registro diario por réplica (I, H, A) y variables registradas a tiempo final de ensayo de manera individual (TME, EEO, E, CA). Mediante el índice Campo de crecimiento, o *Scope for Growth* - (SFG) se integran ambos grupos de mediciones.

Comportamiento y Eficiencia Alimentaria (variables de registro diario).

Ingesta (I), heces (H) y asimilación específica (A).

En la Tabla 5.3, se muestran los resultados obtenidos de I, H y A (J/g PH/día) para los cuatro ensayos obtenidos en los grupos control -MHW.

Tabla 5.3: Ingesta (I), producción de heces (H) y asimilación específica (A) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW. Se muestran los valores estadísticos descriptivos básicos para cada ensayo y para el total de datos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).

Medida	Estación	I	H	A
Media		260,76 ^a	63,24 ^b	197,51 ^b
D.E.	Primavera	52,18	34,03	58,65
E.E.	(N=48)	7,53	4,91	8,47
CV		20,01	53,81	29,69
Media		205,68 ^c	42,82 ^a	162,86 ^b
D.E.	Verano	38,49	18,18	42,19
E.E.	(N=56)	5,14	2,43	5,64
CV		18,71	42,45	25,91
Media		280,64 ^a	40,1 ^a	240,54 ^a
D.E.	Otoño	46,85	17,69	50,6
E.E.	(N=61)	6	2,27	6,48
CV		16,7	44,13	21,04
Media		233,37 ^b	39,38 ^a	194 ^b
D.E.	Invierno	38,98	17,54	42,52
E.E.	(N=33)	6,79	3,05	7,4
CV		16,7	44,55	21,92

En el caso de la I, expresada en valores medios, los animales consumen entre 206 (verano) y 281 (otoño) J/g PH/día de alimento, ingiriendo menos en los ensayos de invierno y verano, con valores de I que difieren significativamente entre sí y de los grupos de primavera y otoño. En relación con las H, los animales producen entre 39 (invierno) y 63 (primavera) J/g PH/día, siendo ésta última significativamente mayor que los restantes grupos. En cuanto a la A se observa que el grupo de otoño asimila significativamente más que los tres restantes. Tanto la I como la A resultaron parámetros de escasa variabilidad intra-ensayo, siendo la principal aportante de variabilidad la producción de H, la que indudablemente repercute sobre los mayores coeficientes de variación (CV). La diferencia del N en cada ensayo fue debido a la exclusión de datos erróneos, como consecuencia de errores de procedimiento metodológico al momento de la toma de muestras de alimento y/o heces. En el ensayo de invierno hubo que desestimar una de las réplicas debido a problemas surgidos durante la exposición con esa pecera.

En la Tabla 5.4 se muestran los valores estadísticos resumen de I, H y A (J/g PH/día) de total de ensayos de los grupos control -MHW.

Tabla 5.4: Ingesta (I), producción de heces (H) y asimilación específica (A) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a medio control -MHW. Se muestran los valores estadísticos descriptivos básicos para el total de datos.

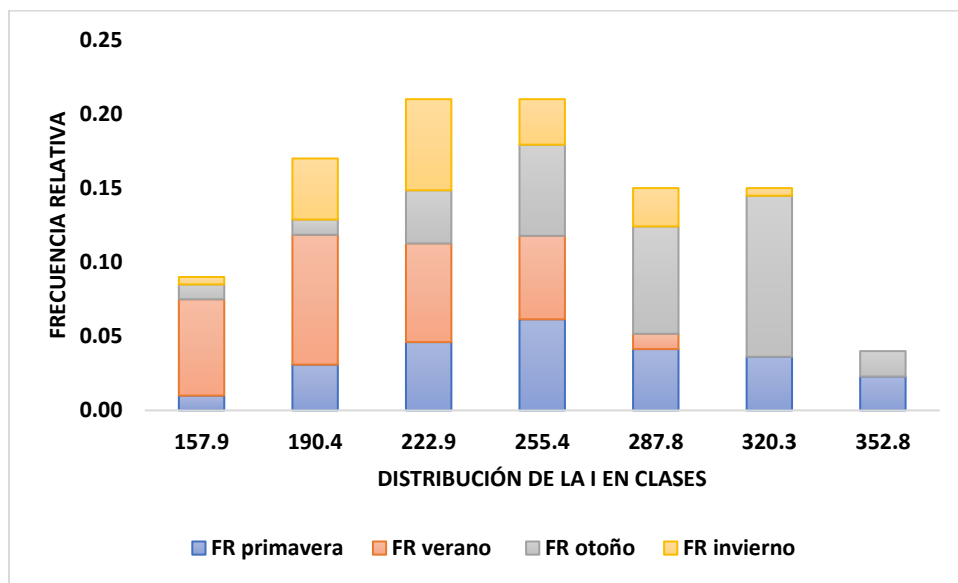
		I	H	A
n		198	198	198
Media		246,74	46,36	200,38
D.E.	Total de ensayos	53,77	24,64	57,44
E.E.		3,82	1,75	4,08
CV		21,79	53,16	28,67

Estos resultados muestran que la I es la variable de menor variabilidad y la producción de heces es la de mayor variabilidad. Como resultante, la A muestra una variabilidad intermedia con un CV ligeramente mayor al aceptable.

Con la finalidad de establecer rangos de valores esperables a lo largo del año, se realizó un análisis de frecuencia para I, H y A tomando el total de datos de los cuatro ensayos.

Ingesta (I):

El análisis de frecuencias arroja un rango de valores de I entre 141.67 y 369 J/g/día distribuidos en 7 clases con ajuste de distribución normal (Figura 5.7). Con excepción de las dos últimas clases, todas incluyen registros de los cuatro ensayos. El grupo de primavera está integrado en un 11, 18, 22, 29, 28, 24 y 57 % las clases 1 a 7 respectivamente, mostrando así una leve tendencia a mayores niveles de ingesta. El grupo de verano integrada en un 72, 52, 32, 27 y 7% de los registros de la clase 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente, mostrando así una tendencia a contar con menores valores de I en verano. El grupo otoño integra en un 2, 2, 7, 12, 14, 21 y 3% las clases 1 a 7 respectivamente, indicando valores de ingesta primordialmente intermedios, y finalmente, el grupo de invierno integra en un 6, 24, 29, 15, 17 y 3% las clases 1 a 5 respectivamente, mostrando así niveles de I principalmente intermedios (ver anexo). Estos resultados entonces permiten establecer como valor de I diaria para adultos de *C. decemmaculatus*, en condiciones de control experimental, un valor medio de 247 y un rango desde 141 hasta 370 J/g PH/día independiente de la estacionalidad.



Ajuste: Normal con estimación de parámetros: Media= 246,7 y varianza= 2891,7

Ing J/g PH/día									
Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	141,67	174,15	157,91	18	0,09	17,53	0,09	0,01	
2	174,15	206,64	190,4	33	0,17	27,6	0,14	1,07	
3	206,64	239,12	222,88	41	0,21	42,72	0,22	1,14	
4	239,12	271,61	255,37	41	0,21	46,42	0,23	1,77	
5	271,61	304,09	287,85	29	0,15	35,4	0,18	2,93	
6	304,09	336,58	320,33	29	0,15	18,95	0,1	8,26	
7	336,58	369,06	352,82	7	0,04	9,39	0,05	8,87	0,0645

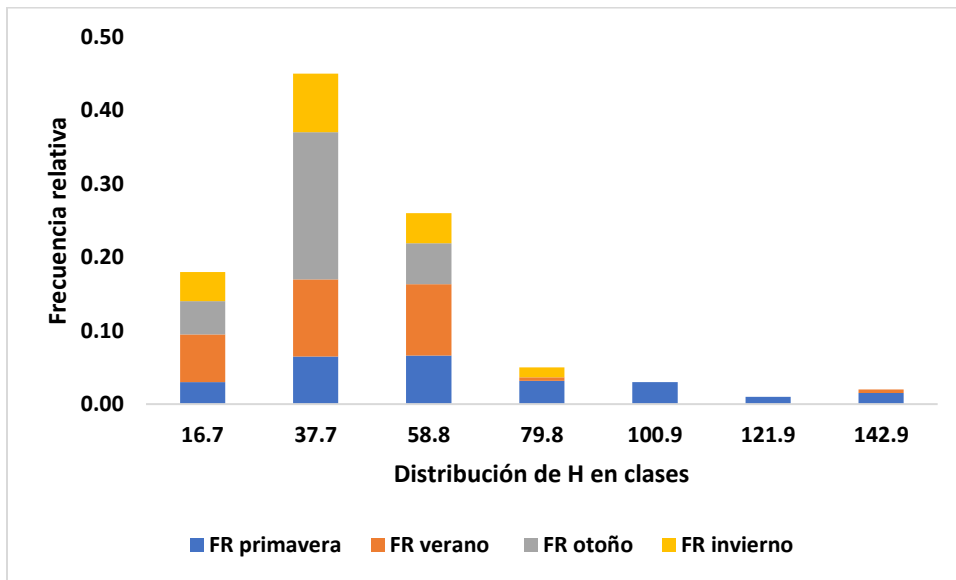
Figura 5.7: Análisis de frecuencia para Ingesta (I) de los grupos control -MHW de los cuatro ensayos estacionales (N = 198). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

Heces (H):

El análisis de frecuencias arroja un rango de valores de producción de heces muy amplio, entre 6.13 y 153.509 J/g/día distribuidos en 7 clases con ajuste de distribución Gama (Figura 5.8). La mayor proporción de registros se encuentran en las tres primeras clases que representan el 89 % del total de registros que disminuiría al nivel superior esperable a 90.34 J/g/día. Las clases 6 y 7 esta compuestas por un total de 5 datos de los que 4 pertenecen al grupo de primavera y uno al de otoño, razón por la cual se dejan fuera del análisis. Respecto a la distribución de registros de los distintos grupos entre clases, se observa que el grupo de primavera integrada en un 17, 14, 25, 70 y 1 % las clases 1 a 5. El grupo de verano integrada en un 36, 23, 37 y 10% de los registros de la clase 1, 2, 3 y 4 respectivamente. El grupo otoño integra en un 25, 44 y 22% las clases 1 a 3 respectivamente y el grupo de invierno integra en un 22, 18, 16 y 30 % las clases 1 a 4

heces J/g/PH/día									
Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	6,13	27,18	16,66	36	0,18	41,68	0,21	0,77	
2	27,18	48,24	37,71	90	0,45	76,23	0,38	3,26	
3	48,24	69,29	58,76	51	0,26	49,03	0,25	3,34	
4	69,29	90,34	79,82	10	0,05	20,74	0,1	8,9	
5	90,34	111,39	100,87	6	0,03	7,03	0,04	9,06	
6	111,39	132,45	121,92	1	0,01	2,08	0,01	9,62	
7	132,45	153,5	142,97	4	0,02	0,56	0,002	30,62	<0,1

respectivamente (ver anexo). Estos resultados ponen en evidencia que no existe una relación entre ensayo y producción de H, siendo independiente de la estación climática.



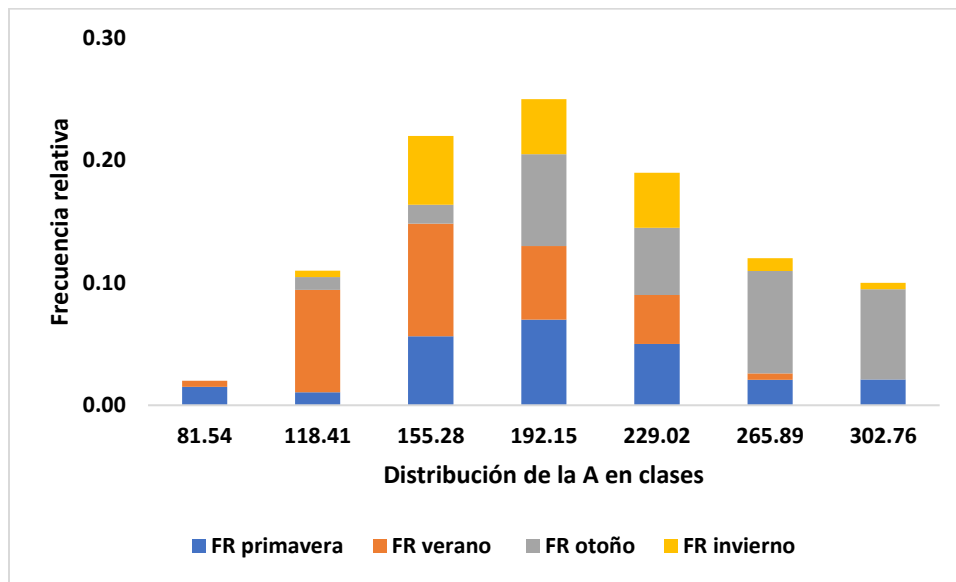
Ajuste: Gama con estimación de parámetros: Lambda= 0,08 y r= 3,9

Figura 5.8: Análisis de frecuencia para producción de heces (H) de los grupos control de los cuatro ensayos estacionales (N = 198). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado. En este caso se seleccionó la de mejor aproximación a los valores de FR.

Asimilación (A):

El análisis de frecuencias arroja un rango de valores de A entre 63.1 y 321.20 J/g/día distribuidos en 7 clases con ajuste de distribución normal (Figura 5.9). La distribución de

valores de cada ensayo es relativamente homogénea entre clases, particularmente las intermedias (3, 4 y 5) que suman el 66% de los registros. Por encima y por debajo de este rango de valores se encuentra un 20 y 13% de los registros. A su vez, el grupo primavera muestra una mayor proporción en las clases 3 y 4, en tanto que el de verano lo hace en las 2 y 3. Por su parte, en el grupo de otoño se distribuyen mayoritariamente en las clases 4 a 7 y el invierno entre las clases 3 a 5. El análisis de esta información permitiría afirmar que el grupo otoño es el de mayor A absoluta en un rango de 173.71 y 321.20 J/g/día. Primavera y verano muestran una menor asimilación relativa en un rango amplio desde 63.10 a 247.46 J/g/día en tanto que el grupo de invierno muestra un rango de valores de A intermedios entre 173.71 y 284.33 J/g/día (ver anexo).



Ajuste: Normal con estimación de parámetros: Media= 202,86 y varianza= 3059,45

Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	63,10	99,97	81,54	4	0,02	7,97	0,04	1,97	
2	99,97	136,84	118,41	21	0,11	18,63	0,09	2,28	
3	136,84	173,71	155,28	43	0,22	37,01	0,19	3,25	
4	173,71	210,59	192,15	50	0,25	49,35	0,25	3,25	
5	210,59	247,46	229,02	38	0,19	44,2	0,22	4,13	
6	247,46	284,33	265,89	23	0,12	26,59	0,13	4,61	
7	284,33	321,20	302,76	19	0,1	14,25	0,07	6,2	0,185

Figura 5.9: Análisis de frecuencia para Asimilación de controles de los cuatro ensayos estacionales (N = 198). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

Se podría entonces, considerar la existencia de una respuesta diferencial de la A en función de la estacionalidad siendo la tendencia a la acumulación de reserva energética mayor durante el otoño. Es esperable que estas reservas se traduzcan en crecimiento, el que se estima mediante el campo de crecimiento o *Scope for Growth* (SFG).

Variables Metabólicas a tiempo final de ensayo

En la Tabla 5.4, se muestran los resultados obtenidos luego de 12 días de exposición en medio control -MHW, de Eficiencia de Extracción de Oxígeno (EEO), Tasa Metabólica Específica (TME), excreción de amonio (E), Cociente de Amonio (CA) y campo de crecimiento (SFG) para los diferentes ensayos estacionales.

Los valores de EEO registraron una muy importante variabilidad dentro de cada grupo, que se manifiesta en coeficientes de variación elevados. Sin embargo, el grupo de primavera es el que menor EEO media registró, respecto a los restantes grupos y el grupo invierno, fue el de mayor valor obtuvo, diferenciándose estadística respecto al grupo verano.

La TME dentro de cada grupo registró una importante variabilidad, que se evidencia en coeficientes de variación elevados. No obstante, el análisis de Kruskal Wallis permite inferir mayor TME en el grupo de otoño y primavera que logran diferenciarse de manera estadística respecto a los grupos invierno y verano.

Los valores de Excreción de amonio registraron una muy importante variabilidad dentro de cada grupo, con muy elevados coeficientes de variación. El grupo primavera fue el que

mostró mayor excreción de amonio, aproximadamente el doble en comparación a los demás grupos, diferenciándose significativamente de ellos.

Tabla 5.4: Eficiencia de Extracción de Oxígeno (EEO), Tasa Metabólica Específica (TME), Excreción de amonio (E) Cociente de Amonio y campo de Crecimiento (SFG) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW. Se muestran los valores estadísticos descriptivos básicos para cada. Letras diferente**es indican diferencias significativas entre grupos (P<0.05).

	Estación	EEO	TMS	E	CA	SFG
N		12	9	10	10	8
Media		2,58 ^a	115,55 ^a	29,11 ^a	0,28 ^a	51,1 ^a
D.E.	primavera	1,24	30,27	11,78	0,17	17,86
E.E.		0,36	10,09	3,73	0,06	6,32
CV		48,15	26,2	40,47	62,69	34,96
N		11	9	8	7	4
Media		6,18 ^c	88,66 ^b	13,12 ^b	0,21 ^a	72,04 ^{a b}
D.E.	verano	4,32	44,81	6,3	0,18	36,2
E.E.		1,3	14,94	2,23	0,07	18,1
CV		69,91	50,54	48,06	82,82	50,25
N		11	9	10	10	7
Media		7,5 ^{b c}	147,79 ^a	16,01 ^b	0,13 ^a	93,66 ^b
D.E.	otoño	1,55	45,85	7,98	0,09	26,43
E.E.		0,47	15,28	2,52	0,03	9,99
CV		20,61	31,02	49,88	71,79	28,22
N		10	8	6	6	6
Media		9,93 ^b	83,86 ^b	14,22 ^b	0,19 ^a	100,36 ^b
D.E.	invierno	3,51	22,06	6,95	0,08	27,84
E.E.		1,11	7,8	2,84	0,03	11,37
CV		35,34	26,3	48,85	44,26	27,74

Como ya fuera mencionado, el Cociente de Amonio integra excreción y consumo de oxígeno, y permite inferir sobre la contribución del catabolismo proteico (asumiendo al amonio como producto final del mismo) al total de energía producida; así, este índice estima la proporción de proteínas que ingresan a la respiración. Como se describió arriba, tanto el consumo de oxígeno como la excreción de amonio mostraron una importante

variabilidad intra-grupos, que obviamente también se manifiesta en el CA. no mostró diferencias significativas entre grupos.

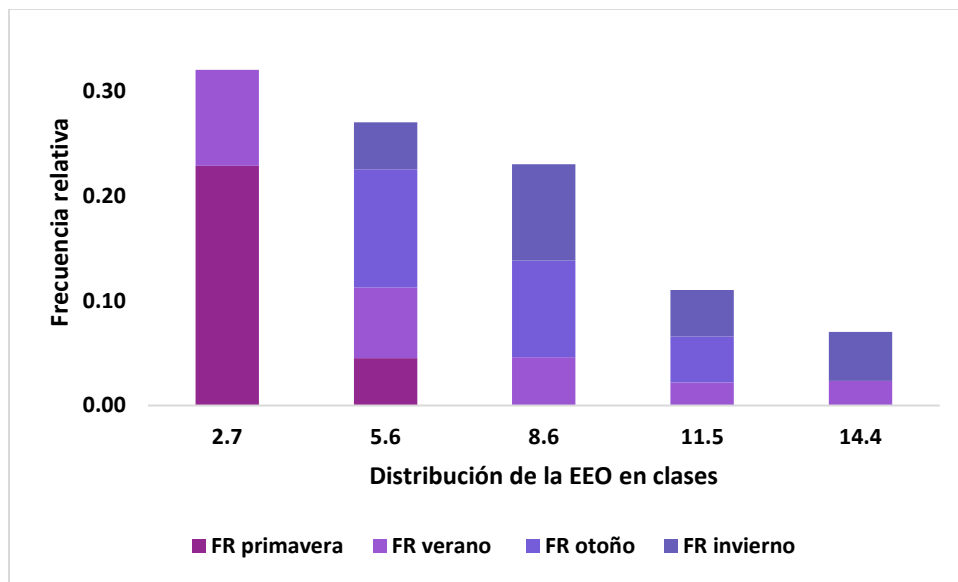
Respecto al Campo de crecimiento o *Scope For Growth*, el grupo de primavera fue el de menor SFG mostrando diferencias significativas con otoño e invierno. Como ya fue descrito, este índice infiere la energía disponible para crecimiento, luego que las demandas energéticas para mantenimiento homeostático (respiración y excreción) fueron descontadas. Así, para valores semejantes de A (por ejemplo, primavera e invierno, Tabla 5.3) el grupo de primavera tiene menos energía disponible para el crecimiento, como resultante de una tasa metabólica más elevada y particularmente un catabolismo proteico alto (Tabla 5.4).

En función de los resultados obtenidos para metabolismo energético es clara la elevada variabilidad individual, no siendo posible establecer una tendencia manifiesta por estación climática. En función de estos resultados se decidió realizar un análisis de frecuencias de los cuatro grupos en conjunto a fin de estimar tendencias por parámetro. En la tabla 5.5 se indican los valores estadísticos básicos para las variables de metabolismo energético del conjunto total de datos.

Tabla 5.5: Eficiencia de Extracción de Oxígeno (EEO), Tasa Metabólica Específica (TME), Excreción de amonio (E), Cociente de Amonio (CA) y campo de Crecimiento (SFG) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes al total de ensayos luego de 12 días de exposición a medio control -MHW. Se muestran los valores estadísticos descriptivos básicos para cada biomarcador.

Variable	EEO	TMS	E	CA	SFG
N	44	35	34	33	25
Media	6,38	109,68	18,87	0,2	78,19
D.E.	3,89	44,16	10,83	0,15	32,2
E.E.	0,59	7,46	1,86	0,03	6,44
CV	61,02	40,26	57,38	72,6	41,18

EEO: La distribución de los valores por frecuencia para EEO (Figura 5.10), oscilaron entre 1.25 y 15.86 %. El análisis da como resultado 5 clases, de las cuales, el 32 % pertenecen a las clases 1 con valores de EEO entre 1.25 y 4.17% e integrada en 70% y 30 % por registros del grupo de primavera y verano respectivamente. La segunda clase, representa el 27% de los valores con un rango entre 4.17 y 7.09 % y está integrada por registros de los cuatro grupos de forma aproximadamente equitativa. A partir de la clase 3 no se registran datos del grupo de primavera y aumentan los registros de los grupos de otoño e invierno. Por lo tanto, en función de estos resultados se podría inferir que la EEO en condiciones control es esperable que oscile entre 1.25 y 10.02%, que corresponde al 82% de los registros con y muestra una distribución de tipo normal, con un comportamiento que parece indicar que en los meses más cálidos la eficiencia es menor y en los meses más fríos mayor.

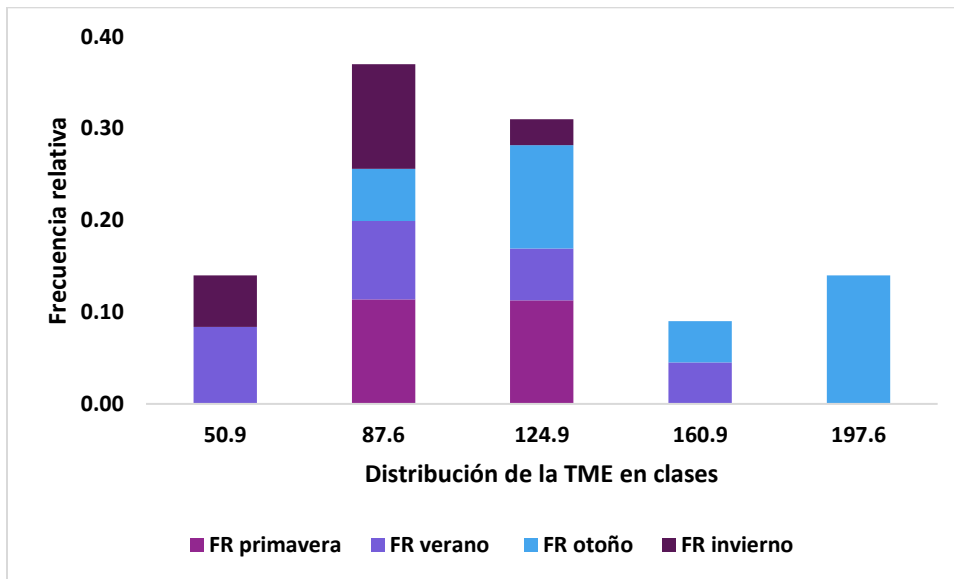


Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	1,25	4,17	2,71	14	0,32	12,54	0,29	0,17	
2	4,17	7,09	5,63	12	0,27	12,64	0,29	0,2	
3	7,09	10,02	8,56	10	0,23	11,09	0,25	0,31	
4	10,02	12,94	11,48	5	0,11	5,69	0,13	0,39	
5	12,94	15,86	14,4	3	0,07	2,03	0,05	0,85	0,6527

Ajuste: Normal con estimación de parámetros: Media= 6,4 y varianza= 15,2

Figura 5.10: Análisis de frecuencia para Eficiencia de Extracción de Oxígeno (EEO) de controles de los cuatro ensayos estacionales (N = 44). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas (E(FA) y E(FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

TME: Los valores de TME oscilaron entre 32.58 y 215.97 J/mg/día. La distribución de los valores por frecuencia se ve en la Figura 5.11) y da como resultado 5 clases, de las cuales el 68 % pertenecen a las clases 2 y 3 con valores de TME entre 69.26 y 142.41. Por encima y por debajo de este rango de valores se encuentra un 18 y 14% de los registros. A su vez, las dos clases mayoritarias, (n=24) están compuestas por registros de los cuatro ensayos estacionales de manera equitativa. Por lo tanto, se podría afirmar que la TME en condiciones control es esperable que oscile mayoritariamente entre 70 y 140 J/g/PH día independientemente de la estación climática y muestra una distribución de tipo normal

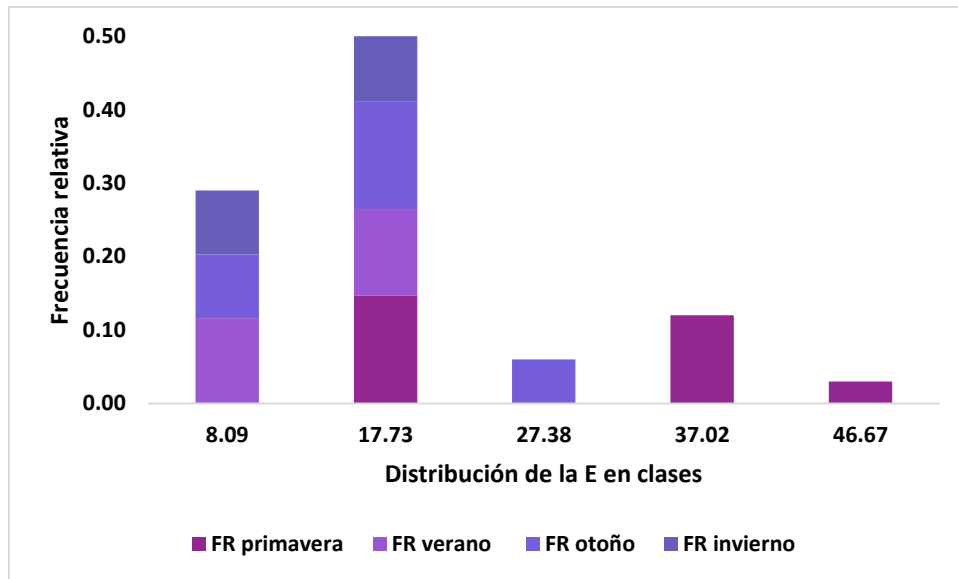


Ajuste: Normal con estimación de parámetros: Media= 109,7 y varianza= 1950,3

Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	32,58	69,26	50,92	5	0,14	6,3	0,18	0,27	
2	69,26	105,94	87,6	13	0,37	10,02	0,29	1,16	
3	105,94	142,61	124,28	11	0,31	10,71	0,31	1,16	
4	142,61	179,29	160,95	3	0,09	5,97	0,17	2,64	
5	179,29	215,97	197,63	3	0,09	2,01	0,06	3,12	0.2097

Figura 5.11: Análisis de frecuencia para la variable TME de controles de los cuatro ensayos estacionales (N = 35). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

Excreción: Los valores de Excreción de amonio oscilaron entre 3.27 y 51.49 J/mg/día. La distribución de los valores por frecuencia (Figura 5.12) da como resultado 5 clases, de las cuales, el 79 % pertenecen a las clases 1 y 2 con valores de Excreción entre 3.27 y 22.56. Solo un 20 % de los registros de excreción se encuentra por encima de este rango de valores. A su vez, de las dos clases mayoritarias, (n=27) están compuestas de manera equitativa por registros de los cuatro ensayos. Por lo tanto, se podría afirmar que la excreción en condiciones control es esperable que oscile mayoritariamente entre 3.27 y 22.56 J/g/PH día independientemente de la estación climática siendo las distribuciones de tipo Gamma las de mejor ajuste.

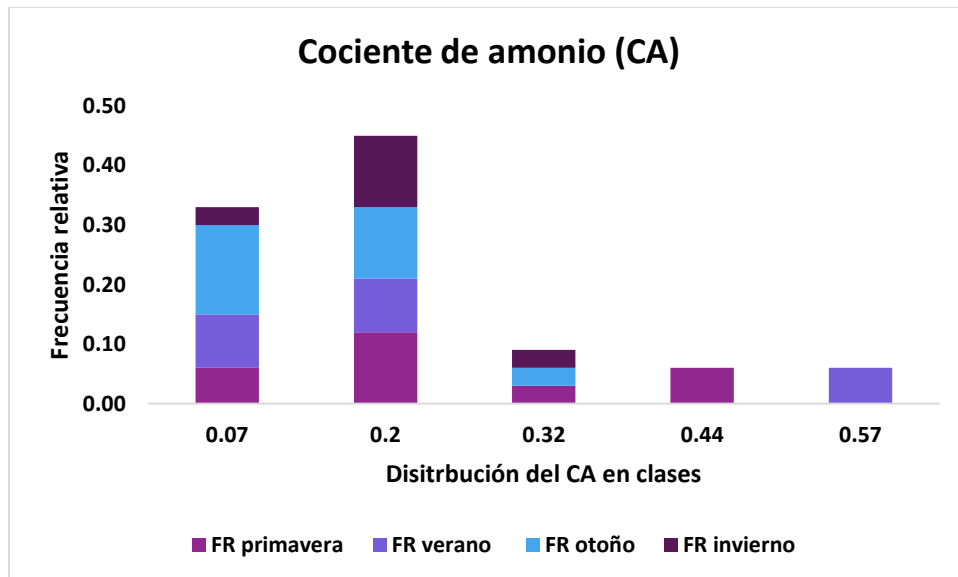


Ajuste: Gama con estimación de parámetros: Lambda= 0,15 y r= 2,9

Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	3,27	12,91	8,09	10	0,29	11,66	0,34	0,24	
2	12,91	22,56	17,73	17	0,5	11,94	0,35	2,38	
3	22,56	32,20	27,38	2	0,06	6,4	0,19	5,4	
4	32,20	41,84	37,02	4	0,12	2,62	0,08	6,12	
5	41,84	51,49	46,67	1	0,03	1,38	0,04	6,23	0,0444

Figura 5.12: Análisis de frecuencia para la variable excreción de amonio (E) de controles de los cuatro ensayos estacionales (N = 34). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

CA: El rango de valores de CA fue entre 0.01 y 0.63. La distribución de los valores por frecuencia (Figura 5.13) da como resultado 5 clases, de las cuales, el 78 % pertenecen a las clases 1 y 2 con valores de CA 0.01 y 0.26. Solo un 20 % de los registros de CA se encuentra por encima de este rango de valores. A su vez, de las dos clases mayoritarias, (n=26) están compuestas de manera relativamente equitativa, por registros de los cuatro ensayos. Por lo tanto, se podría afirmar que es esperable que en condiciones control el CA oscile entre 0.01 y 0.26 independientemente de la estación climática siendo la distribución de tipo gama las de mejor ajuste. El CA sigue el comportamiento de la Excreción.

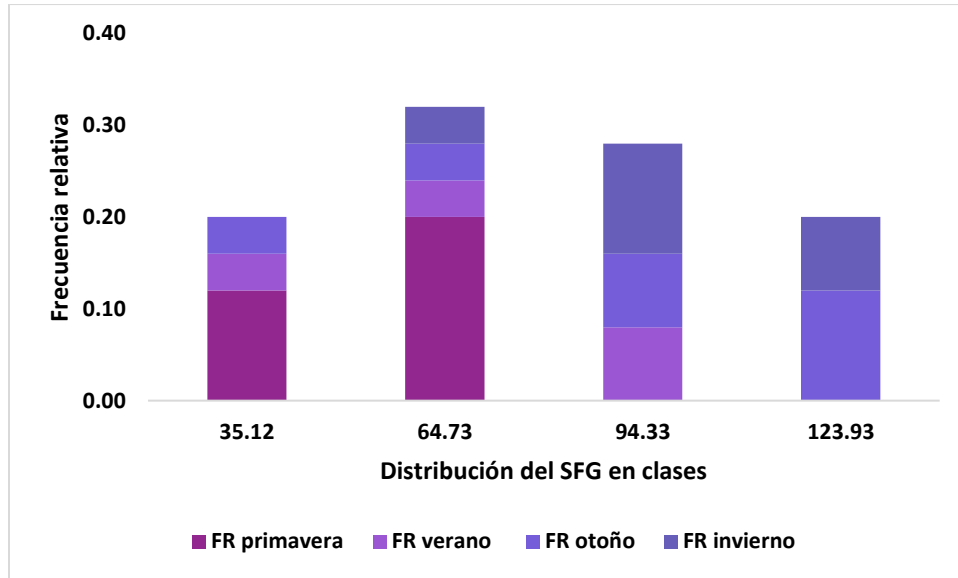


Ajuste: Gama con estimación de parámetros: Lambda= 9,7 y r= 1,9

Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	0,01	0,13	0,07	11	0,33	12,71	0,39	0,23	
2	0,13	0,26	0,2	15	0,45	11,13	0,34	1,58	
3	0,26	0,38	0,32	3	0,09	5,5	0,17	2,71	
4	0,38	0,51	0,44	2	0,06	2,29	0,07	2,75	
5	0,51	0,63	0,57	2	0,06	1,38	0,04	3,03	0,2195

Figura 5.13: Análisis de frecuencia para la variable CA de controles de los cuatro ensayos estacionales (N = 33). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

SFG: La distribución de los valores por frecuencia para el SFG (Figura 5.14) da como resultado 4 clases, (n=25) de las cuales, el 60 % pertenecen a las clases 2 y 3 con valores de SFG entre 50 y 109 J/g/PH día. El 40% restante se distribuyen equitativamente por encima y por debajo de este rango. A su vez, la distribución de registros entre clases arroja que el grupo primavera se encuentra entre las clases 1 y 2 que también incluye dos registros del grupo de otoño, dos del de verano y uno de invierno. la clase 3 incluye dos registros del grupo de otoño, dos del de verano y uno de invierno y la clase 4 incluye tres registros del grupo de otoño y dos del de invierno, siendo la distribución de tipo normal la de mejor ajuste. Por lo tanto, se podría afirmar que SFG en condiciones control oscila entre 20.32 y 138.73 J/g/día siendo esperable los menores valores para la estación de primavera, coincidente con la época de mayor actividad reproductiva, mostrando un comportamiento estacional.



Ajuste: Normal con estimación de parámetros: Media= 78,2 y varianza= 1036,7

Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-Cuadrado	P
1	20,32	49,93	35,12	5	0,2	4,75	0,19	0,01	
2	49,93	79,53	64,73	8	0,32	8,16	0,33	0,02	
3	79,53	109,13	94,33	7	0,28	7,88	0,32	0,11	
4	109,13	138,73	123,93	5	0,2	4,21	0,17	0,26	0,6078

Figura 5.14: Análisis de frecuencia para la variable SFG de controles de los cuatro ensayos estacionales (N = 25). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

4.3 Variables bioquímicas: Biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos.

En el caso de los biomarcadores bioquímicos se midió para cada ejemplar: la actividad específica de la acetilcolinesterasa cerebral -AChE con el objeto de evaluar actividad a nivel nervioso (colinérgico) y, para la evaluación del daño oxidativo a nivel hepático se valoraron la actividad específica de Catalasa -CAT y glutatión-S-transferasa-GST, así como el contenido de glutatión reducido -GSH.

Acetilcolinesterasa cerebral

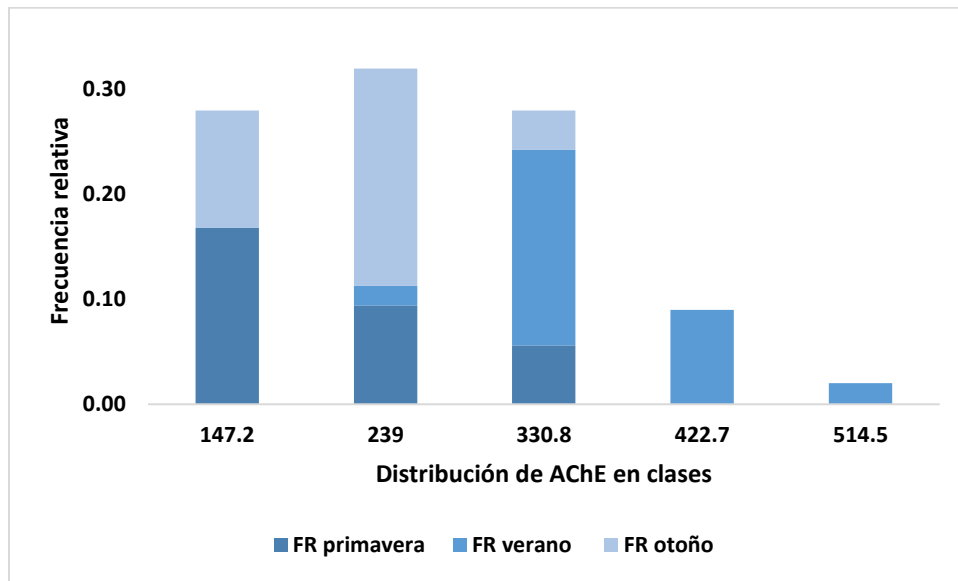
En la tabla 5.6 se muestran los resultados obtenidos para la actividad específica de la AChE (nmol/min.gr prot) tanto por ensayo como por el total de datos. El grupo de verano mostró una actividad específica significativamente mayor respecto a primavera y otoño (ANOVA con comparaciones de Tukey). Estos resultados son concordantes con los reportados por Menendez-Helman *et al.* (2015) quienes establecen un ritmo circanual para esta enzima con picos de actividad durante el verano.

Tabla 5.6: Actividad de acetilcolinesterasa cerebral (AChE) en *Cnesterodon decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a medio control -MHW. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ensayos.

AChE cerebro				
Ensayo	Primavera	verano	otoño	totales
N	19	17	17	53
Media	196,59	369,9*	222,17	260,39
D.E.	57,47	56,19	50,4	93,71
EE	13,18	13,63	12,22	12,87
CV	29,23	15,19	22,69	35,99

El análisis de frecuencia sobre el total de registros de los tres ensayos (Figura 5.15) da como resultado 5 clases, de las cuales aproximadamente el 90 % de los datos se distribuyen en las clases 1 a 3, con valores de actividad de AChE de entre 101.25 y 376.74 nmol/min. g prot. Además, dentro de las 3 clases mayoritarias (n=47) se observa una distribución preferencial por ensayo, así, la clase 1 está integrada en un 60% por el grupo de primavera y un 40% por el de otoño, la clase 2 está integrada en aproximadamente un 30% por el grupo de primavera, un 5% por el grupo de verano y un 65% por el de otoño y la clase 3 está integrada en aproximadamente un 20% por el grupo de primavera, un 67% por el grupo de verano y en un 20% por el de otoño; la clase 4 se compone solo de un registro de verano y representa el 2% del total. La distribución en clases de los registros de AChE da claros indicios de variación de actividad en función de la estacionalidad y

reafirman los resultados por ensayo antes descriptos. En resumen, podemos afirmar que es esperable que la actividad de AChE en condiciones control oscilen entre 101 y 376 nmol/min.g prot, mostrando una distribución normal de datos, con los valores más altos registrados para el grupo verano, concordante con lo mostrado por Menendez Helman (2015).



Ajuste: Normal con estimación de parámetros: Media = 260,39 y varianza= 8782,13

AChE (nmol/min.gr prot)									
Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(AF)	E(RF)	Chi-square	p
1	101,25	193,08	147,17	15	0,28	12,52	0,24	0,49	
2	193,08	284,91	239	17	0,32	19,45	0,37	0,8	
3	284,91	376,74	330,83	15	0,28	15,35	0,29	0,8	
4	376,74	468,57	422,66	5	0,09	4,98	0,09	0,8	
5	468,57	560,40	514,49	1	0,02	0,7	0,01	0,94	0,626

Figura 5.15: Análisis de frecuencia para AChE de controles de los bioensayos de primavera, verano y otoño (N = 53). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

Biomarcadores hepáticos de estrés oxidativo

En la Tabla 5.7 se muestran los resultados obtenidos para las actividades específicas de CAT, GST y contenido de GSH en hígado de adultos de *C. decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a medio control -MHW tanto por ensayo como por el total de datos. El N total fue de 53 animales.

Tabla 5.7: Actividad CAT, GST y contenido de GSH en hígado de *Cnesterodon decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a medio control -MHW. Se muestran los valores estadísticos descriptivos básicos para cada ensayo y para el total de datos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).

Medida	Biomarcador	Ensayo				totales
		primavera	verano	otoño	invierno	
n		14	5	19	15	53
Media		216,43 ^a	186,55 ^a	254,36 ^a	149,52 ^a	202.17
D.E.	CAT	123,9	66,52	123,26	46,64	111.46
EE		33,11	29,75	28,28	12,04	15.03
CV		57,24	35,66	48,46	31,19	55.18
n		14	5	18	15	52
Media		0,28 ^{a b}	0,27 ^{a b}	0,39 ^{a c}	0,15 ^b	0.27
D.E.	GST	0,12	0,08	0,16	0,07	0.15
EE		0,03	0,03	0,04	0,02	0.02
CV		44,85	28,57	40,32	46,92	55.08
n		7	5	18	15	45
Media		33,64 ^a	11,98 ^c	21,73 ^b	10,56 ^c	18.85
D.E.	GSH	5,31	4,25	9,4	6,04	10.76
EE		2,01	1,9	2,21	1,56	1.59
CV		15,79	35,42	43,25	57,15	57.07

La actividad de la Catalasa (CAT) hepática no registró diferencias significativas entre ensayos, si bien se observó una tendencia a mayor actividad en el ensayo de otoño y el de primavera (ANOVA con comparaciones de Tukey).

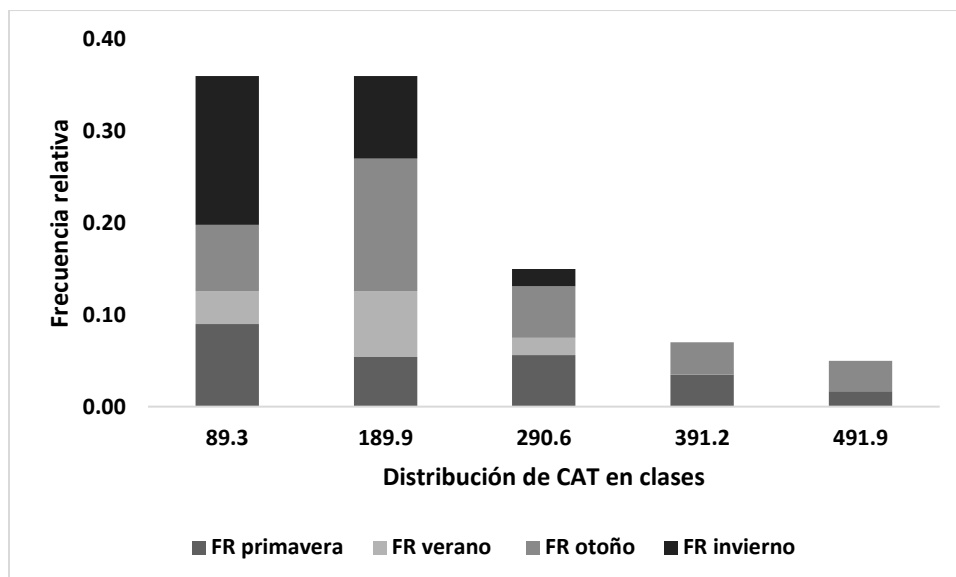
Respecto a la GST hepática, los ejemplares del grupo otoño mostraron valores de actividad de aproximadamente el doble que los registrados en los restantes ensayos, con diferencias estadísticas respecto al grupo de invierno (ANOVA con comparaciones de Tukey).

Respecto al contenido de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tejido) en el hígado, en el grupo de primavera se registraron contenidos de GSH de aproximadamente el triple respecto a los grupos verano e invierno, significativamente diferente de estos y del grupo otoño, el cual además también mostró diferencias significativas respecto del grupo verano e invierno (ANOVA con comparaciones de Tukey).

A partir del del análisis de los resultados de biomarcadores de estrés oxidativo y en función de la importante variabilidad registrada dentro de cada grupo, se puede concluir que no existe evidencia suficiente para presumir estacionalidad. De esta manera, con el propósito de poder establecer rangos de valores esperables en situaciones control experimental se realizaron análisis de frecuencias para cada uno de los parámetros utilizando el total de los datos de los 4 ensayos para cada caso.

Catalasa

El análisis de frecuencia sobre el total de registros de los cuatro ensayos (Figura 5.16) da como resultado 5 clases con valores de actividad entre 59 y 542.18AE -mmoles H_2O_2 hidrolizado/min/mg. El 73 % de los registros se encuentran dentro de las clases 1 y 2, con valores de actividad de CAT entre 59.00 y 252.54 (AE -mmoles H_2O_2 hidrol/min/mg). En las dos clases mayoritarias el 20% de los registros pertenecen al grupo de primavera, 15% al grupo verano, 30 % al de otoño y 35 al de invierno. Esta composición sugiere una tendencia a mayores valores de CAT durante el invierno. La clase 3 representa un 15% del total de los registros y está compuesta por un 37% de registros de primavera y otoño y un 12% de registros de verano e invierno respectivamente. Las siguientes dos clases, que representan el 10% del total están integradas por registros de primavera y otoño exclusivamente.



Ajuste: Gamma con estimación de parámetros: Lambda= 0,02 y r= 4,4CAT (AE (mmoles H2O2 hidrol/min/mg))

Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-square	p
1	59,45	156,00	107,72	21	0,40	18	0,34	0,5	0,2985
2	156,00	252,54	204,27	17	0,32	20	0,38	0,95	
3	252,54	349,09	300,82	8	0,15	10,8	0,19	1,42	
4	349,09	445,63	397,36	5	0,09	3,53	0,07	2,03	
5	445,63	542,18	493,91	2	0,04	1,29	0,02	2,42	

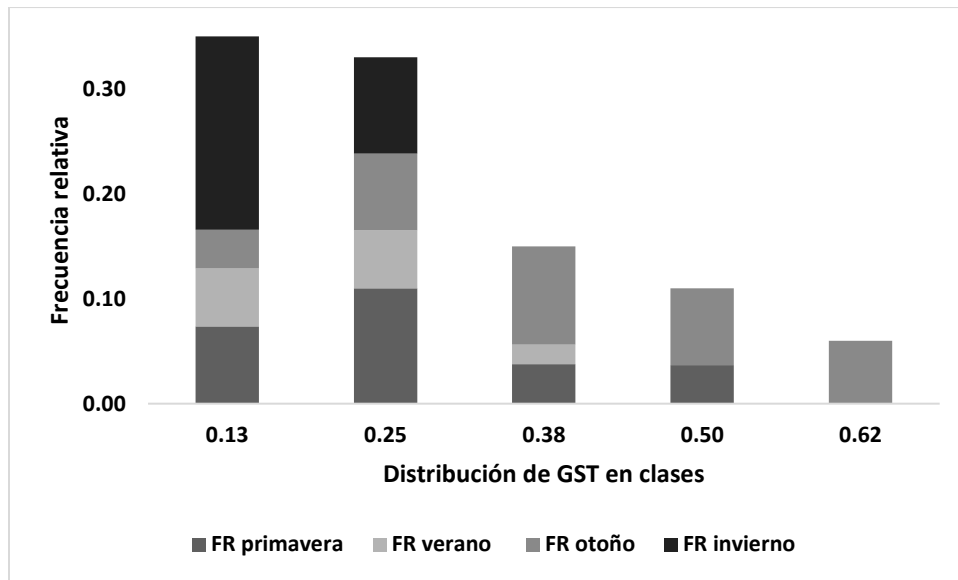
Figura 5.16: Análisis de frecuencia para CAT h de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno (N = 53). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E(FA) y E(FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

Tanto el ajuste de distribución, de tipo Gama, como la composición de las clases indican que es esperable que los valores de CAT hepático en condiciones de control experimental se encuentren entre 59 y 252 AE -mmoles H₂O₂ hidrol/min/mg independientemente de la estación climática.

Glutación S-Transferasa hepática

Para GST (Figura 5.17), la distribución de los valores por frecuencia da como resultado 5 clases, de las cuales casi el 70 % de los datos pertenecen a las clases 1 y 2, con valores de entre 0.07 y 0.31 U/ mg Pr. Las dos clases mayoritarias (n= 35) están compuestas en un

27% por registros del grupo de primavera, un 16% tanto para verano como para otoño y un 40% por registros de invierno. Del 30 % restante (n=17), 28 % pertenecen al grupo otoño y un 14% a primavera. Dada esta distribución de datos, que muestran un ajuste de distribución Gama, podemos afirmar que para condiciones control es esperable que el rango de actividad para GST hepática sea de 0.07 y 0.68 U/ mg Pr, considerando que el grupo de otoño se encuentra representado en todas las clases, pero en mayor proporción a partir de la clase 3. Se observa una tendencia a mostrar mayor actividad de GST en otoño, que además demostró ser significativamente mayor que los tres restantes grupos (ver Tabla 5.7).



Ajuste: Gama con estimación de parámetros $\Lambda = 12,28$ y $r = 3,43$

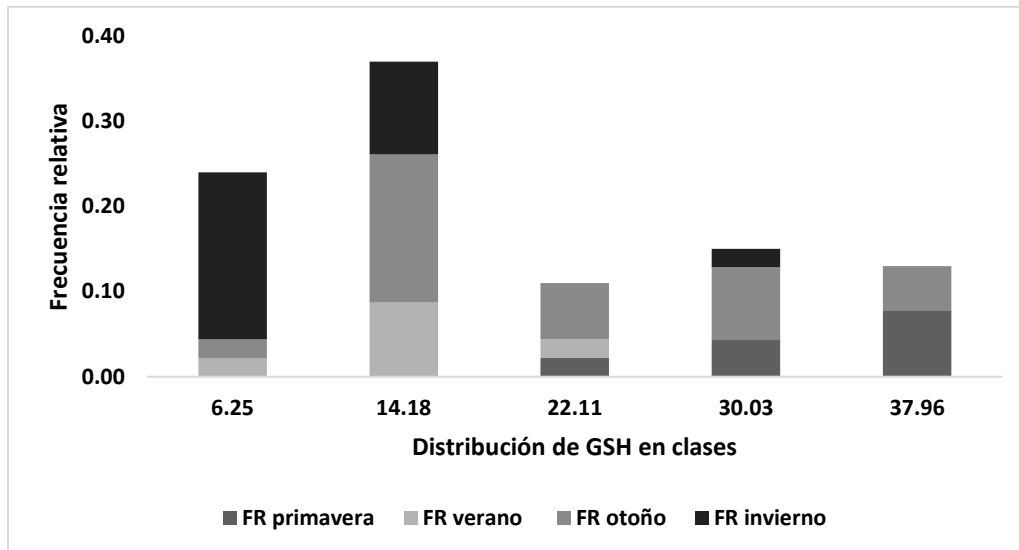
GST (U/ mg Pr)									
Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-cuadrado	p
1	0,07	0,19	0,13	17	0,33	16,68	0,32	0,1	0,6143
2	0,19	0,31	0,25	18	0,35	17,44	0,34	0,2	
3	0,31	0,44	0,38	8	0,15	10,43	0,2	0,59	
4	0,44	0,56	0,50	6	0,12	4,70	0,09	0,95	
5	0,56	0,68	0,62	3	0,06	2,74	0,05	0,97	

Figura 5.17: Análisis de frecuencia para GST de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno (N = 52). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas

(FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

Glutación

Por último, la distribución de los valores por frecuencia para GSH hepático (Figura 5.18) también mostró 5 clases, de las que la clase 1 (11 datos) y la clase 2 (17 datos) poseen el 24 % y 40 % aproximadamente del total de datos respectivamente. El 39 % restante de datos pertenece a las clases 3-5. Las clases mayoritarias tienen un rango de valores entre 2.3 a 18 $\mu\text{mol/g}$ tejido y están integradas en un 50% por registros del ensayo de invierno, 32% por registros del ensayo de otoño y un 18% por los del ensayo de verano. Las clases restantes, con un rango de valores ente 18 y 42 $\mu\text{mol/g}$ tejido, están integradas en un 50% por registros del ensayo de otoño, 33% por registros del ensayo de primavera y un 12% por los del ensayo de invierno y verano. Dada esta distribución de datos, con ajuste de distribución Gama, podemos afirmar que para condiciones control es esperable que el rango de GSH hepático se encuentre entre 2.3 y 42 $\mu\text{mol/g}$ tejido siendo esperable el menor contenido de GSH en hígado durante los meses fríos.



Ajuste: Gama con estimación de parámetros Lambda= 0,15 y r= 2,76

GSH ($\mu\text{mol/g}$ tejido)									
Clase	LI	LS	MC	FA	FR	E(FA)	E(FR)	Chi-cuadrado	p
1	2,29	10,22	6,25	11	0,24	10,77	0,24	4,9E ⁻⁰³	
2	10,22	18,14	14,18	17	0,38	14,34	0,32	0,50	
3	18,14	26,07	22,11	4	0,09	10,01	0,22	4,11	
4	26,07	33,99	30,03	7	0,16	5,42	0,12	4,57	
5	33,99	41,92	37,96	6	0,13	4,46	0,10	5,10	0,0782

Figura 5.18: Análisis de frecuencia para GSH de controles de los bioensayos de primavera, verano, otoño e invierno (N = 45). La tabla corresponde a la mejor distribución de ajuste. se muestran para cada clase el límite inferior (LI), el límite superior (LS), la media por clase (MC), las frecuencias absolutas (FA) y relativas (FR) así como Frecuencias esperadas E (FA) y E (FR) según el modelo de mejor distribución de ajuste. Estimador estadístico Chi cuadrado.

5 DISCUSION

En este capítulo se evaluó la variabilidad de biomarcadores biométricos, metabólicos y bioquímicos seleccionados en adultos de *C. decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a medio control -MHW bajo condiciones controladas de laboratorio. El propósito fue contribuir para establecer una línea de base, o rango normal, de dichos biomarcadores, así como también poder conocer posibles comportamientos estacionales en alguno de ellos. Además, se pudo apreciar la variabilidad para cada parámetro, relacionada a la respuesta homeostática individual, brindando una aproximación de los niveles de respuesta esperados para cada biomarcador en las condiciones experimentales. Las líneas de base o valores basales de los biomarcadores resultan así de aquellas respuestas en animales control útiles como referencia y/o valores de comparación respecto a valores obtenidos para los biomarcadores estudiados en animales que son expuestos a situaciones de estrés por exposición a tóxicos.

Cabe tener en cuenta que los animales utilizados en los ensayos provienen de criadero con condiciones ambientales y alimentación controladas y estandarizadas, motivo por el cual es esperable que las cohortes de ejemplares utilizadas en experimentación se encuentran libres de contaminantes respecto a los animales obtenidos del ambiente

natural y además tengan una variabilidad genética relativamente menor, tanto por ser de cautiverio como por procedencia de la población silvestre de origen del criadero (arroyo Las Flores, Latitud -35.6, Longitud -59.0167).

Los organismos nativos utilizados en experimentación a nivel regional son usualmente obtenidos del ambiente y sometidos a un periodo de aclimatación de extensión variable previo al inicio de los ensayos. Además, los medios de dilución utilizados como control también son diversos, tanto en su perfil fisicoquímico como en su reproducibilidad. En este trabajo, se utilizó como medio control agua reconstituida moderadamente dura - MHW, la que fue protocolizada para ensayos de letalidad en juveniles de *C decemmaculatus* (Mastrángelo & Ferrari, 2013), y que debe asumirse como un medio experimental en sí mismo. De hecho, el MHW es utilizado como medio control en exposiciones prolongadas por primera vez en este trabajo. Así, los resultados obtenidos no necesariamente establecen niveles homeostáticamente normales para la especie, sino solo para la situación de control experimental aquí utilizada. Se espera que estos resultados, sean útiles para sentar las bases de futuros trabajos comparativos con otros medios control y con poblaciones silvestres de diferentes sitios. De hecho, actualmente, en el PRODEA, se encuentra en ejecución un proyecto que aborda esta temática.

Una visión simplificada sobre los animales criados en laboratorio es que permite contar con disponibilidad a lo largo de todo el año, y que estableciendo de manera permanente condiciones de temperatura y fotoperiodo similares a las de épocas reproductivas, se logra extender y amplificar ese periodo y obtener una mayor producción. No obstante, supuestos de este calibre deben ser cuidadosamente considerados en vista de las particularidades de cada especie durante las diferentes etapas de su ciclo de vida, especialmente en ensayos de evaluación de efecto temprano. Además, es esperable que no todos los parámetros que se evalúen respondan de igual manera pudiendo verificarse respuestas semejantes a las esperables en condiciones naturales para algunos de ellos, e incluso interacciones debidas a las condiciones de cría, no detectables en condiciones naturales. En ese sentido, este capítulo aporta información sobre la exposición a condiciones de control experimental sobre un set de biomarcadores de diferente índole,

que permitirán establecer algunas pautas sobre diseño de ensayos de efecto temprano con fines de monitoreo.

Como se dijo más arriba, hay que considerar que existe una fluctuación de valores esperados en algunos de los biomarcadores estudiados vinculada a la estacionalidad. Esta fluctuación puede influir en la variabilidad de las respuestas de dichos biomarcadores, aun en condiciones de laboratorio e independientes del medio externo. Así, entre otros trabajos, Menéndez Helman *et al.*, (2015) describieron el comportamiento circanual de la actividad de la AChE en *C. decemmaculatus*; Sanchez *et al.*, (2008) la producción de vitelogenina en *Gasterosteus aculeatus*; y Nahrgang *et al.*, 2010 informaron un comportamiento influenciado por las diferentes estaciones del año sobre la actividad de GST y CAT sobre la especie *Boreogadus saida* en ensayos realizados a campo.

Respecto a los parámetros biométricos, nuestros resultados experimentales evidenciaron que hubo mucha variabilidad dentro de cada grupo de ensayo (intra ensayo) especialmente para peso corporal y talla (Tabla 5.1). Por ello, si bien peso y talla de los ejemplares del grupo verano fueron estadísticamente diferentes al resto de los grupos según el ANOVA realizado, el ajuste de clases mediante el análisis de frecuencias permitió deducir que, las clases mayoritarias estaban conformadas por ejemplares provenientes de los cuatro ensayos estacionales (figuras 5.1 y 5.2). Es destacable que mientras que ambos parámetros (peso corporal y talla) siguen una distribución de tipo normal, el FC sigue una distribución de tipo gama (figura 5.3) quedando clara una disminución tanto de la variabilidad total como intra ensayo al momento de establecer como variable la relación peso-longitud. Estos resultados permiten concluir que los cuatro grupos son biométricamente comparables entre sí y similares durante todo el año, y validan las comparaciones inter ensayos. Así, se puede concluir que el FC no tiene un comportamiento estacional y su valor en condiciones control experimental en MHW se encuentra en el rango de 0.58 y 0.83 (Figura 5.3). Un resultado y comportamiento similar del FC fue hallado para *C. decemmaculatus* en medio control -MHW por Menéndez Helman (2015), que obtuvo un comportamiento similar de este biomarcador a lo largo del año en mediciones estacionales sin diferencias significativas a través de este período, incluso

también sin ser homogéneo el tamaño de los animales (peso y talla) durante las diferentes estaciones climáticas. Otros autores también han reportado valores similares de FC para esta especie (de la Torre, 2007; Ossana *et al.*, 2016, 2019) en exposiciones con agua corriente no clorada, mientras que valores levemente mayores han sido reportados para ejemplares hembras obtenidos del ambiente en la zona del San Francisco y la Represa Roggero (de la Torre, 2007; Ossana *et al.*, 2016, 2019) del Río Reconquista, en tanto que Zambrano *et al.*, 2018 reportan valores de FC de aproximadamente el doble para machos provenientes del río Suquía en la Pcia. de Córdoba. Si bien es un hecho conocido que los animales ectotermos pueden sufrir cambios en la tasa de crecimiento cuando están sometidos a diferentes temperaturas (Ma *et al.*, 2015), al encontrarse en condiciones controladas de laboratorio, la temperatura es una de las condiciones controladas y estable tanto en cultivo como en ensayo y por ello no se ven diferencias entre los 4 grupos control pertenecientes a los ensayos estacionales.

Resultados semejantes se obtuvieron para los dos índices restantes, IHS, el IGS, ambos con una distribución de tipo gama (Figuras 5.4 y 5.5) y ausencia de diferencias entre ensayos (Tabla 5.1 y 5.2) permitiendo concluir entonces que ni el IHS ni el IGS registran variaciones estacionales.

En relación al IHS el rango de valores registrados en MHW fue mayoritariamente entre 0.53 y 2.14. Este rango de valores es el frecuentemente registrado para la especie tanto en condiciones de cautiverio como en individuos provenientes de diferentes poblaciones naturales de diferente grado de contaminación (de la Torre *et al.*, 2005, 2007; Bonifacio *et al.*, 2016; Zambrano *et al.*, 2018, entre otros). El IHS ha sido postulado como un biomarcador directamente relacionado con los efectos tóxicos que ocurren sobre el hígado. Así, un índice bajo respecto a control puede indicar una disminución de las reservas hepáticas debido a los gastos energéticos que ocurren al enfrentar un evento tóxico mientras que, un incremento del IHS puede reflejar cambios patológicos como hipertrofia o hiperplasia de los hepatocitos (Goede & Barton, 1990). No obstante, el agrandamiento del hígado podría ser una respuesta no específica a los tóxicos, debido a la mayor demanda de actividad enzimática en el hígado (Toft *et al.*, 2003) no solo por efecto

de los tóxicos sino en relación con el ciclo reproductivo. Indudablemente, ambas situaciones deberían ser evaluadas en conjunto para una mejor interpretación de este parámetro y en ese sentido el uso de controles paralelos resulta fundamental.

Respecto al IGS, los resultados obtenidos son esperables de acuerdo a la estrategia reproductiva de la especie, la cual posee gestación intra-folicular y superfetación, pudiéndose encontrar hembras preñadas y ovarios en diferentes estados madurativos a lo largo del año. En un trabajo descriptivo sobre la reproducción de *C. decemmaculatus*, Berois (1993) informaron que las dimensiones de los ovarios varían con la edad de la hembra y con la época del año, además de encontrarse también grandes cantidades de espermatozoides vivos dentro de cistos en los repliegues de la luz del oviducto y en la cavidad interna del ovario, posibilitando gestaciones sucesivas sin mediar coito. No obstante, el trabajo de Berois (1993) fue realizado con animales colectados de su ambiente natural durante las épocas reproductivas (septiembre a mayo).

Un trabajo realizado por Nahrgang (2010), quien estudió *in situ* un pez del ártico de la especie *Boreogadus saida*, encontró que la línea de base para el IHS y el IGS diferían entre sexos y que eran mayores los valores para las épocas más cálidas, haciendo hincapié en la estacionalidad de estos parámetros en la especie estudiada. En *C. decemmaculatus* bajo condiciones controladas de laboratorio, la variabilidad hallada para IGS en los distintos ensayos aporta información para considerar que, en condiciones de laboratorio no es posible establecer una estacionalidad respecto al desarrollo de los ovarios, a pesar de que en condiciones naturales se observan dos épocas de picos reproductivos, primavera y otoño.

En resumen, se puede observar que el FC, el IHS y el IGS no tuvieron un comportamiento estacional bajo condiciones controladas de laboratorio en medio control -MHW, pudiéndose establecer un rango de valores como línea de base para cada uno de estos biomarcadores.

Al analizar los resultados obtenidos para los biomarcadores metabólicos de registro diario, las variables del comportamiento y eficiencia alimentaria pusieron de manifiesto que existe un comportamiento estacional para la Asimilación; El análisis comparativo

(ANOVA) de la ingesta y producción de heces entre ensayos indicaron la existencia de una menor ingesta para invierno y verano y mayor producción de heces durante primavera (Tabla 5.3). Sin embargo, el análisis de frecuencias (Figura 5.7) arrojó para la I una distribución normal de los registros con clases compuestas por los cuatro grupos. Este análisis permitió establecer el rango de I de la especie bajo las condiciones de ensayo en un intervalo de 141 a 372 J/g ph/día. Por otra parte, la producción de heces (Figura 5.8), mostró una distribución de tipo gama con un rango de 6 a 69 J/g ph/día. Es decir que ni la Ingesta ni H, analizadas de manera individual permitieron inferir estacionalidad, lo que se hace evidente al analizar la A. Si bien la I tuvo poca variabilidad intra-ensayo, no fue el caso para la producción de H, que se convirtió en la principal causa de variabilidad repercutiendo en los valores de A calculados a partir de ambos parámetros. En este caso, el análisis por ensayos manifestó un incremento de la A del grupo otoño respecto al resto, que también pudo comprobarse en el análisis de frecuencia, de distribución normal (Figura 5.9), que si bien muestra solapamiento de registros de los cuatro ensayos permite inferir que el grupo otoño es el de mayor A absoluta en un rango de 173.71 y 321.20 J/g/día y valores de A más bajos en los ensayos de meses más cálidos. Juveniles de *Cyprinus carpio*, con pesos corporales aproximados de 6 g y en condiciones experimentales semejantes mostraron ingestas diarias 10 veces por encima a las aquí obtenidas (Ferrari *et al.*, 2011), no obstante, expresando los valores como eficiencia de asimilación ambas especies muestran % comparables, cercanos al 80%.

En resumen, pareciera existir una tendencia a la acumulación de reservas energéticas durante la temporada otoñal, meses en los cuales las poblaciones silvestres tiene un segundo pico reproductivo, previo además a la escasez de alimento esperable durante el invierno. Más adelante se discutirá su influencia en el SFG. La A entonces podría ser una de las variables no silentes aún en situación de cautiverio con condiciones ambientales estables. El comportamiento alimentario puede estar influenciado tanto por agentes externos como la hora del día, las condiciones ambientales y las estaciones climáticas, así como por factores internos que involucran al sistema endócrino y sensorial (Volkoff *et al.*, 2005; Volkoff & Wyatt, 2009 Hoskins & Volkoff, 2012). En esta tesis se cuantifican por

primera vez, parámetros de alimentación para *C. decemmaculatus* en condiciones experimentales a lo largo del año.

En relación a los parámetros medidos a tiempo final de ensayo, solo la EEO y el SFG manifestaron un comportamiento relativamente estacional. La TME con una distribución de tipo normal (Figura 5.11) mostró valores mayores en el grupo de primavera y otoño, sin embargo, la distribución de los registros en las distintas clases puso en evidencia que la variabilidad de datos era compartida intra e inter-ensayos, por lo que no puede deducirse estacionalidad para este parámetro. Un comportamiento semejante (pero con una distribución de tipo gama) pudo apreciarse para la E y el CA (Figuras 5.12 y 5.13). Cabe destacar que el valor de CA obtenido fue comparable y numéricamente inferior respecto al valor máximo de CA calculado teóricamente sobre el aporte de proteínas durante el metabolismo aeróbico propuesto para teleósteos (de Boeck, 2012). La E es una herramienta útil para determinar los efectos del ambiente y los factores nutricionales del metabolismo proteico (Uliano *et al.*, 2010; Fournie *et al.*, 2003), mientras que el CA estima la proporción de proteínas envueltas en la respiración (De Boeck *et al.*, 1995; Owen *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 2010), siendo un indicador del catabolismo proteico. Los resultados obtenidos concuerdan con la bibliografía citada, debido a que los animales en el medio control no mostraron diferencias entre las estaciones, por lo que el comportamiento alimentario, la digestión de proteínas o el funcionamiento hepático no se ven afectados.

Sin embargo, no fue el caso para la EEO y el SFG. Así, la EEO fue considerablemente menor en el ensayo de primavera respecto a los tres restantes (Tabla 5.4), con una distribución de tipo normal y un comportamiento que parece indicar menos eficiencia en los meses más cálidos respecto a los meses más fríos (Figura 5.10 y 5.11). El SFG siguió el mismo comportamiento, los grupos de invierno y otoño fueron los de mayor valor.

Como se mencionó con anterioridad, el SFG es un índice que integra ingreso y egreso de energía, e indica la cantidad de energía disponible para crecimiento. Si bien no es un biomarcador específico, puede ser de utilidad para evaluar el estado general de los organismos, ya que da una medida del rendimiento metabólico individual y puede proporcionar información relevante a nivel de la población. La estacionalidad en el SFG

con mayores valores durante los meses fríos (normalmente de reposo reproductivo) podría ser un escenario esperable, si el alimento no fuera un factor limitante, sugiriendo que este es mayor independiente de los procesos de gestación que, como se ha visto, si bien en menor medida, continúan durante otoño e invierno. Como destaca Vega (2004) en un trabajo realizado en *Chirostoma estorestor*, donde evalúa la eficiencia en la asimilación de diferentes dietas, la energía que es asimilada se traduce en energía fisiológicamente útil, la cual a su vez es destinada al metabolismo de rutina (lo que incluiría la época reproductiva) o al crecimiento. Así, estos dos últimos biomarcadores (A y SFG) parecen nuevamente tener su comportamiento *seteado* de manera independiente a las condiciones externas. Las evaluaciones sobre el balance energético en animales acuáticos han demostrado ser de gran utilidad pues a través de éstas es posible conocer la forma en que los organismos usan la energía y la convierten en biomasa, gametos o la utilizan para compensar las variaciones ambientales permitiéndoles mantener su homeostasis (Rosas, 2003). Parece ser de suma importancia entonces, conocer el rango de valores de estos biomarcadores metabólicos, dada la estacionalidad que algunos de ellos tienen, para un buen uso de los datos obtenidos en animales control -MHW bajo condiciones controladas de laboratorio y su posterior comparación con grupos expuestos a un determinado ambiente. Estos resultados sobre el metabolismo energético son los primeros reportados para la especie.

Respecto a los biomarcadores bioquímicos, se registró un comportamiento estacional para la AChE, con mayor actividad en el grupo de verano respecto a los otros dos grupos evaluados (Figura 5.15) y que fue coincidente con lo reportado para la misma especie por Menendez Helman (2015), quienes describen para la enzima un comportamiento sinusoidal, con la mayor actividad durante el verano y la menor durante la temporada fría. Es importante tener en cuenta que el citado trabajo utiliza ejemplares colectados de la población de origen de nuestro cultivo (arroyo Las Flores) y que los organismos capturados, luego de una aclimatación de 15 días, son mantenidos por 7 días en MHW en condiciones de temperatura y fotoperiodo semejantes a las utilizadas por nosotros. Una consideración adicional merece el tejido utilizado, ya que en tanto las determinaciones

realizadas en este trabajo fueron hechas sobre cerebro, Menendez Helman *et al.* utilizaron cabeza completa.

Nuestros resultados entonces, alientan a suponer que este comportamiento de la AChE tiende a conservarse aún en condiciones ambientalmente estables de cautiverio por un lado y por otro son útiles para validar ambos procedimientos para la determinación de la enzima. Otros reportes describen también la variación estacional de la actividad de esta enzima en peces; Chuiko (1997) determinó la existencia de las fluctuaciones estacionales de AChE en cerebro de *Rutilus rutilus*, mostrando la elevada actividad enzimática al principio de la temporada de verano y la mucho menor actividad durante el invierno.

En cuanto a los biomarcadores de estrés oxidativo en hígado (Figura 5.17 y 5.18), la CAT no registra variaciones entre ensayos, en tanto que la GST como el GSH mostraron un comportamiento variable. La GST mostró un pico de actividad en el grupo de otoño, teniendo relación esta respuesta con la obtenida para el SFG en el mismo grupo, mientras que el contenido de GSH mostró un pico en el grupo de primavera y uno menor en el grupo de otoño. Si bien estos resultados hacen presuponer un comportamiento estacional, deben ser cuidadosamente analizados, en vista de la elevada variabilidad registrada intra-ensayo. Sin embargo, el análisis de frecuencias realizado para los tres biomarcadores de estrés oxidativo evaluados, permitieron confirmar la respuesta diferencial entre ensayos para GST y GSH, así como la ausencia de ella para CAT, pudiendo determinar la estacionalidad existente en ambos biomarcadores. Esto podría estar relacionado entonces con la necesaria acumulación de reservas energéticas en los meses fríos. Sardi (2016) realizó ensayos con diferentes especies de organismos acuáticos para determinar la línea de base de determinados parámetros, en donde demostró que aquellos animales tomados del sitio de referencia (control) sufrían modificaciones estacionales de determinados biomarcadores de estrés oxidativo como CAT y GST, entre otros, atribuyendo a la estacionalidad como la gran aportadora de variabilidad de estos parámetros. Además, las épocas reproductivas demandan un gasto extra de energía, usualmente acompañado de un aumento en las especies reactivas del oxígeno que se traduce en una mayor actividad de las defensas antioxidantes (Alonso Alvarez *et al.*,

2014), y que podría explicar el valor de GSH durante primavera, el cual se induce en peces en condiciones de estrés, siendo la primera barrera del sistema antioxidante envuelta en proteger a los animales por un posible daño oxidativo (Saleh, 2016).

6 CONCLUSIONES

Existe una importante variabilidad individual de los distintos biomarcadores utilizados, común a todos los ensayos.

Los datos obtenidos permiten establecer rangos esperables luego de 12 días de permanencia en condiciones de control experimental en MHW que se resumen en el siguiente cuadro:

Biomarcador	Rango de valores esperables	comportamiento estacional
FC	0.58 a 0.83	independiente de la estación climática
IHS	0.53 y 2.14	independiente de la estación climática
IGS	0.35 y 1.04	independiente de la estación climática
Ingesta	141 hasta 370 J/g PH/día	independiente de la estación climática
Heces	6.13 y 90.34 J/g PH/día	independiente de la estación climática
Asimilación	173.71 y 321.20 J/g PH/día	Mayor valor en otoño
TME	70 y 140 J/g/PH día	independiente de la estación climática
Excreción	3.27 y 22.56 J/g/PH día	independiente de la estación climática
CA	0.01 y 0.26	independiente de la estación climática
EEO	1.25 y 10.02%,	Menores valores en primavera
SFG	20.32 y 138.73 J/g/día	Mayores valores en invierno y otoño
AChE cerebral	101 y 376 nmol/min.g prot	Mayor actividad en verano
CAT hepática	59 y 252 AE -mmoles H ₂ O ₂ hidrol/min/mg	independiente de la estación climática
GSH hepático	2.3 y 42 μ mol/g tejido	Menor actividad en invierno
GST hepático	0.07 y 0.68 U/ mg	Mayor actividad en otoño

En resumen, el uso correcto de respuestas biológicas como biomarcadores, requiere de un conocimiento de la variabilidad en ambiente natural y experimental para la especie, así como también del conocimiento en los posibles cambios estacionales sobre el metabolismo, los ciclos reproductivos y el estado nutricional, entre otros. La selección de diferentes biomarcadores y el potencial uso que se les pueda dar, está relacionado al tipo

de metodología necesaria que debe considerarse antes de implementarlos en los programas de monitoreo, donde debe tenerse en cuenta el mantenimiento homeostático de los organismos y, consecuentemente, la variabilidad que introducen los ciclos reproductivos, la disponibilidad del alimento y la variación temporal del ambiente. Agregamos a esto que es necesario contar con conocimientos acerca del comportamiento de los potenciales biomarcadores en condiciones experimentales. En este sentido, los valores obtenidos sobre las variables biológicas para la obtención de una línea de base en condiciones controladas de laboratorio, constituyen una fuente importante de información clave acerca de la biología de *C. decemmaculatus* y su utilización como especie modelo en bioensayos ecotoxicológicos de efecto temprano.

CAPÍTULO 6

Evaluación del efecto de la exposición al cadmio como tóxico de referencia sobre parámetros biométricos, bioenergéticos y bioquímicos en adultos de *C. decemmaculatus* en laboratorio

1 INTRODUCCIÓN

En el campo de la ecotoxicología, el estudio mediante la aplicación de bioensayos estandarizados es clave para poder llegar a conclusiones que de alguna manera revelen el verdadero impacto que los contaminantes presentes en el ambiente puedan causarle a la biota del lugar. Los protocolos y la metodología en los bioensayos deben estar estandarizados y ello incluye al organismo prueba seleccionado, los medios de dilución y el tóxico de referencia. El organismo de ensayo debe preferente haber sido validado para su uso en bioensayos de ecotoxicidad. El proceso de validación incluye, dentro de un diseño experimental estandarizado, la caracterización de las respuestas de los diferentes *endpoints* en medio control y en medio contaminando con un tóxico referente, o control positivo, que produzca respuestas diferenciales respecto al medio control.

En el capítulo 5 se abordó el comportamiento de los diferentes *endpoints* en medio control. El presente capítulo se ocupa de la caracterización de las respuestas a Cloruro de Cadmio (Cl_2Cd), seleccionado como tóxico referente para la especie.

El Cl_2Cd para ser utilizarlo como tóxico de referencia en ensayos ecotoxicológicos fue sugerido desde hace años por diferentes agencias de estudio ambiental (EC, 1990; US EPA, 1993, 2001). La elección se basó en su elevada toxicidad a relativamente bajas concentraciones para una variedad de componentes de la biota acuática.

El cadmio (Cd) como tóxico referente en *C. decemmaculatus*, ha sido utilizado desde hace mucho tiempo en ensayos de letalidad con juveniles (de la Torre *et al.*, 1997) y más recientemente se estableció una carta control para el mismo (Mastrángelo & Ferrari, 2013). Sin embargo, si bien *C. decemmaculatus*, y en particular adultos de la especie, ha sido utilizado desde hace bastante tiempo como especie modelo (de la Torre *et al.*, 2002, 2005, 2007; Menendez Helman *et al.*, 2015; Bonifacio *et al.*, 2016, entre otros) para la evaluación de efectos tempranos, no se dispone de información relativa a ningún tóxico referente para estos parámetros.

Por lo tanto, en el presente estudio se pretende contribuir al incremento del conocimiento sobre el efecto del Cd en adultos de *C. decemmaculatus* y su implementación como tóxico de referencia en bioensayos ecotoxicológicos de efecto temprano. En este capítulo se evalúan parámetros ecofisiológicos y ecotoxicológicos sobre la especie mencionada cuando es expuesta a una concentración sub-tóxica nominal de 0.5 mg Cd/l MHW. Los resultados se contrastan respecto a los controles paralelos en MHW de cada ensayo estacional, considerando tanto la estacionalidad como la concentración efectiva media de Cd en cada ensayo.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO

La hipótesis que se pone a prueba es que: adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* expuesta en condiciones de laboratorio a estrés por contaminación del medio con Cd, sufren alteraciones en parámetros biométricos, metabólicos y bioquímicos, los que alteran algunas de las funciones básicas de los individuos y su *fitness*.

El objetivo es profundizar sobre el conocimiento de las respuestas de los distintos *endpoints* utilizados en *C. decemmaculatus*, determinando los efectos por exposición a concentraciones sub-tóxicas de Cd, a fin de proponerlo como tóxico de referencia en bioensayos de efecto temprano.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Sobre la base de los resultados obtenidos en el capítulo 5 de resultados, para los análisis comparativos relativos a medio control se utilizaron los grupos paralelos en MHW (establecidos como línea de base) y por el otro se utilizaron los grupos expuestos a una concentración nominal de Cd 0.5 mg/l, pertenecientes en ambos casos a los cuatro ensayos estacionales. En el cuadro siguiente se indica la composición de los grupos a analizar N = 101 animales.

Ensayo	Control MHW	Cadmio
Primavera	10 machos y 9 hembras	2 machos y 7 hembras
Verano	15 hembras y 3 machos	1 macho y 9 hembras
Otoño	21 hembras y 1 macho	3 machos y 7 hembras
Invierno	14 hembras y 1 macho	1 macho y 9 hembras

Medios utilizados:

-Control negativo, medio MHW (agua moderadamente dura).

-Control positivo, Cadmio 0.5 mg/l (concentración nominal) en MHW: La concentración de exposición se preparó por dilución a partir de una solución stock de CdCl₂ · 2,5 H₂O en agua destilada de 1000 mg Cd/l. La concentración final analítica (media±DS) para cada uno de los bioensayos es la indicada en la tabla 4.3, Capítulo 4.

Las variables que se analizaron fueron, al igual que en capítulo precedente, agrupadas en las siguientes categorías:

- 4) Biométricas: peso corporal, talla, Factor de Condición (FC) e índice hepato-somático (IHS); Con excepción del ensayo de primavera, también se calculó el Índice Gónado Somático en hembras (IGS).
- 5) Metabólicas: Ingesta (I), heces (H) y asimilación específica (A); Tasa metabólica específica (TME); Eficiencia de extracción de oxígeno (EEO%); Excreción de amonio (E); Cociente de amonio (CA); Campo de Crecimiento o *Scope For Growth* (SFG).

- 6) Bioquímicas: actividad de la Acetilcolinesterasa cerebral (AChE); Catalasa (CAT), Glutathion S-Transferasa (GST), contenido de Glutathión reducido (GSH) en el hígado.

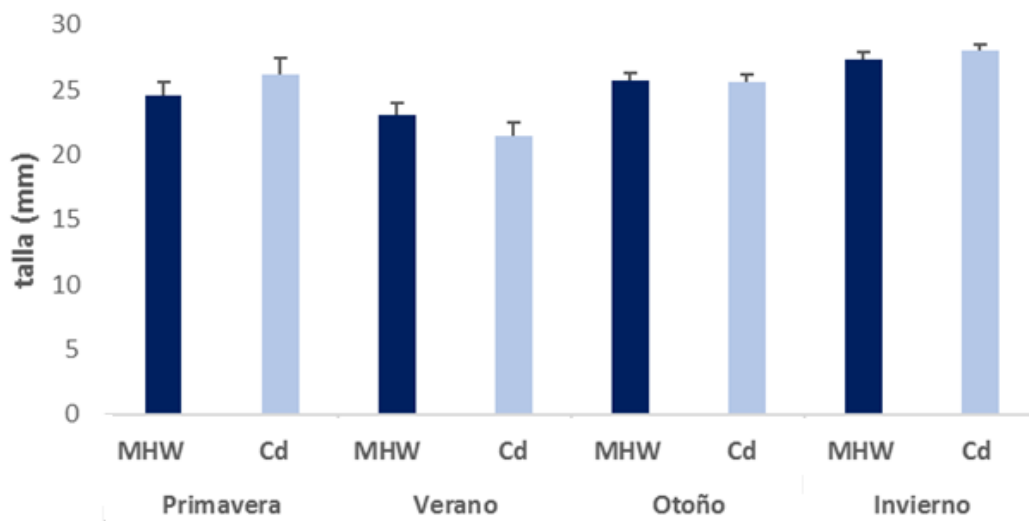
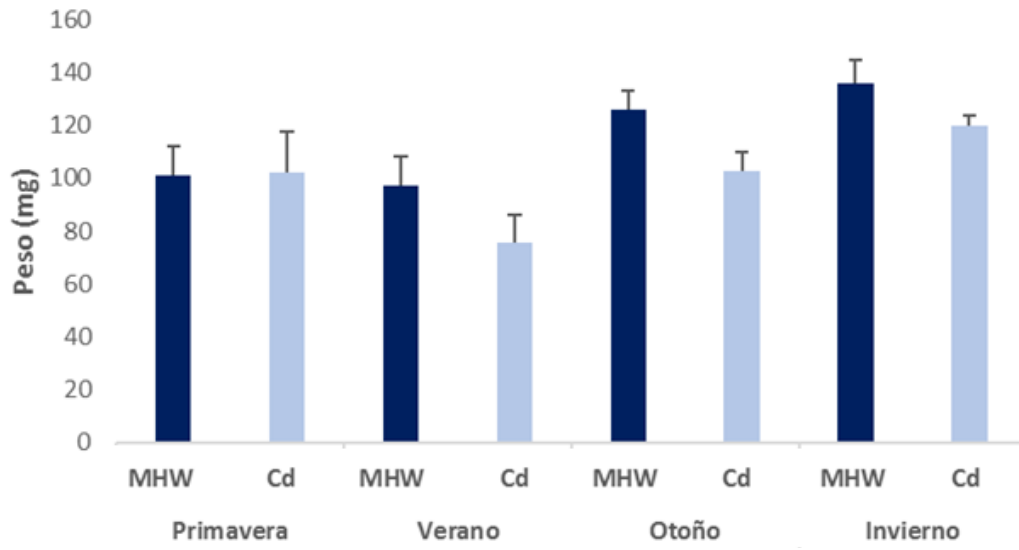
Para el análisis de los resultados de cada uno de los ensayos, así como comparaciones entre tratamientos, se realizó un ANOVA de un factor seguido de comparaciones múltiples de Tukey. Se aplicó análisis de Kruskal Wallis con comparaciones de a pares utilizando el programa estadístico INFOSTAT versión 2018e (Di Rienzo *et al.*, 2014).

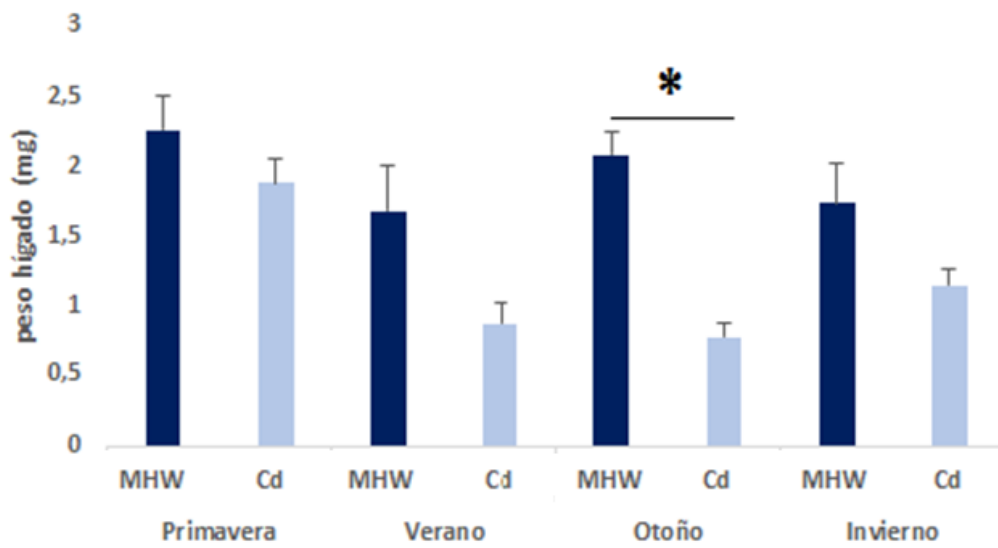
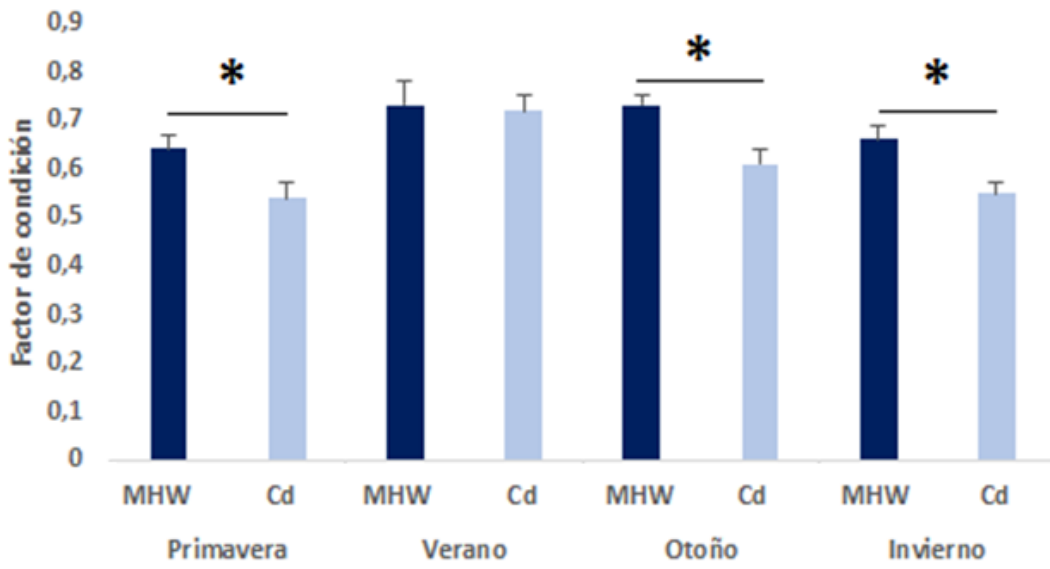
4 RESULTADOS

Al finalizar el período de exposición y como ya fuera informado en el Capítulo 4 (Figura 4.1), los animales expuestos al Cd registraron una mortalidad media acumulada entre 37 (ensayo de verano) y 60% (ensayo de otoño) aproximadamente. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para los biomarcadores analizados diariamente y a tiempo final de exposición de los ejemplares sobrevivientes al tratamiento.

4.1 Variables Biométricas

En el anexo se muestran los parámetros estadísticos descriptivos básicos para Talla, Peso corporal, Factor de Condición (FC), índice Hepato-somático (IHS) de adultos de *C. decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición para medios control -MHW y Cd. En la Figura 6.1 se grafican los valores medios \pm EE de los parámetros biométricos considerados de cada ensayo y ambos grupos.





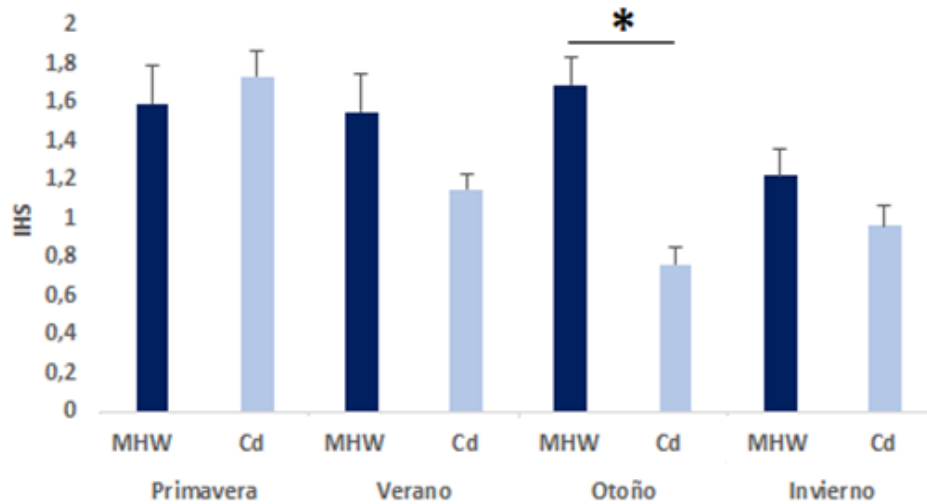


Figura 6.1: Talla, Peso corporal, Factor de Condición (FC), peso del hígado e índice hepato-somático (IHS) de adultos de *C. decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o Cd. Se muestran los valores medios \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas del grupo expuesto a Cd respecto el control paralelo en MHW ($P < 0.05$).

El peso y la talla de ambos grupos experimentales fueron muy similares entre sí a lo largo de los cuatro bioensayos, sin mostrar diferencias significativas respecto a control -MHW, si bien, se visualiza una tendencia de descenso del peso en los grupos expuestos a Cd (Kruskall Wallis con comparaciones de a pares).

El factor de condición (FC), de los grupos Cd de los ensayos primavera, otoño e invierno poseen valores significativamente menores que sus controles contemporáneos (Kruskall Wallis con comparaciones de a pares). Este resultado probablemente sea influenciado por el descenso de peso corporal en el grupo Cd.

En cuanto al peso de los hígados y el IHS, prácticamente todos los grupos expuestos al Cd de los cuatro bioensayos mostraron un descenso importante de ambos parámetros respecto a los controles en MHW, aunque solamente se encontraron diferencias significativas en el ensayo de otoño (Kruskall Wallis con comparaciones de a pares).

En la figura 6.2, se muestran los resultados obtenidos para el índice Gónado-somático de hembras (IGS) y el peso de los ovarios calculados en los bioensayos de verano, otoño e invierno tanto para los grupos control en MHW como para los grupos expuestos al Cd.

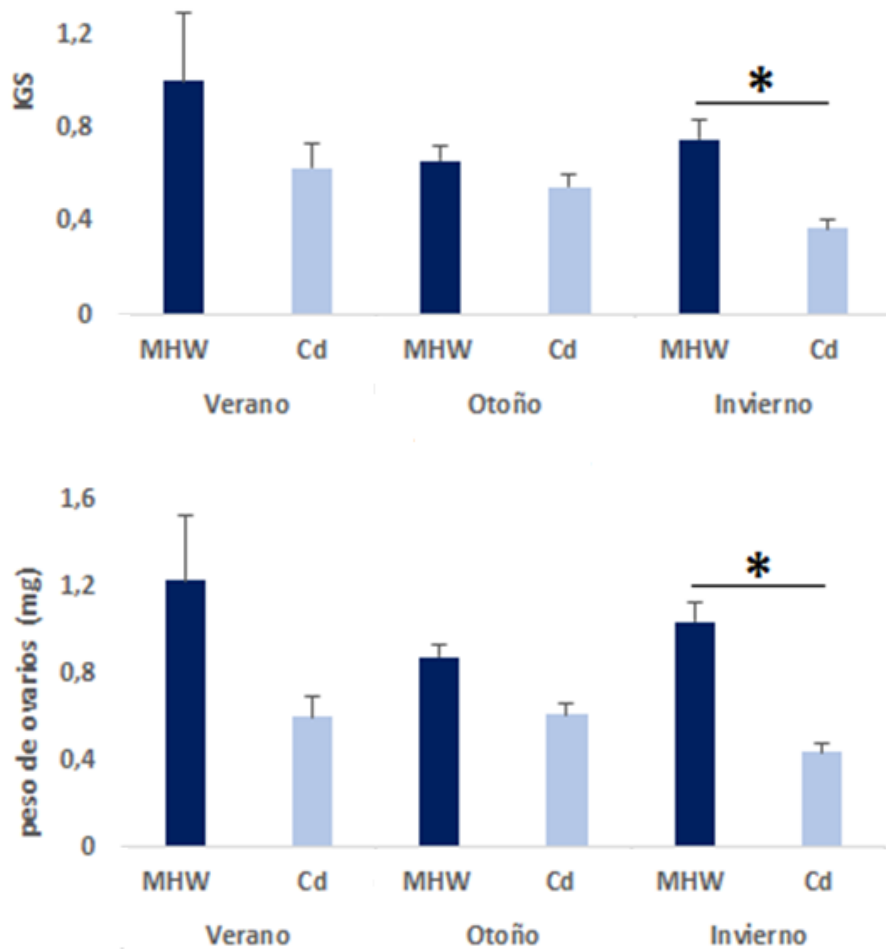


Figura 6.2: índice Gónado-somático de hembras (IGS) y peso de ovarios de adultas de *C. decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o Cd. Se muestran los valores medios \pm EE para cada ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre del grupo expuesto a Cd respecto el control paralelo en MHW ($P < 0.05$).

En el grupo expuesto a Cd, en todos los ensayos se registraron valores menores de peso de ovarios y en consecuencia IGS menores, respecto a los controles paralelos, no obstante, solo son significativamente menores en el grupo de invierno (Kruskall Wallis con comparaciones de a pares). Del análisis de los datos se hace evidente que si bien en los tres ensayos considerados, la dispersión de datos es elevada, en el grupo expuesto a Cd ésta es menor, en particular en el ensayo de invierno, aportando así diferenciación.

4.2 Variables del Metabolismo Energético

El efecto del Cd sobre el metabolismo energético se evalúa considerando los resultados de las distintas variables de comportamiento y eficiencia alimentaria, de registro diario por réplica (I, H, A), las variables registradas a tiempo final de ensayo por ejemplar (TME, EEO, E, CA) y el SFG. Para el análisis estadístico se aplicó Kruskal Wallis con comparaciones de a pares: grupo expuesto a Cd vs su control paralelo en MHW

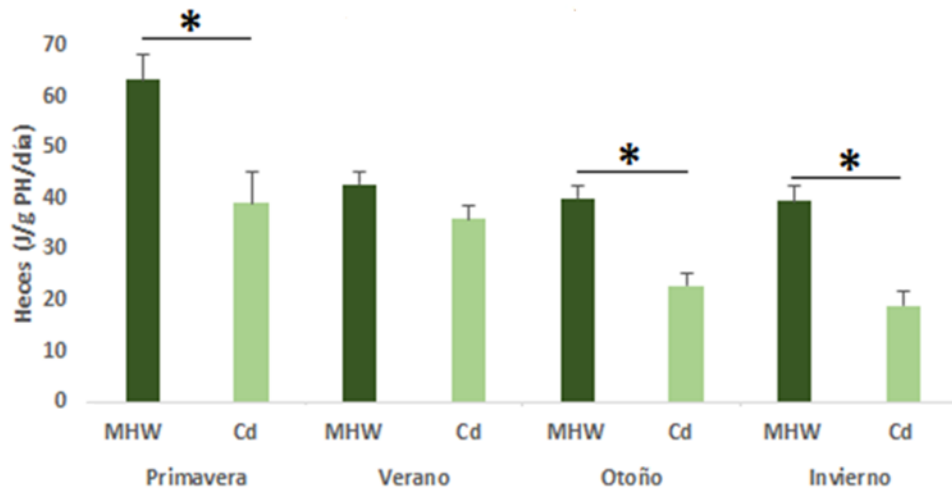
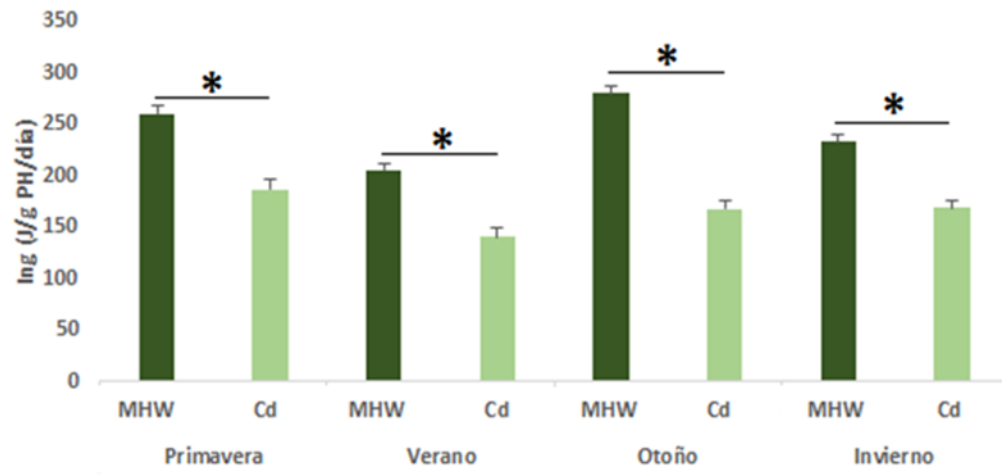
Comportamiento y Eficiencia Alimentaria (variables de registro diario).

Ingesta (I), heces (H) y asimilación específica (A).

En la figura 6.3, se muestran los valores medios obtenidos de I, H y A (J/g PH/día) para los cuatro ensayos estacionales de los grupos control-MHW y Cd.

Para los cuatro bioensayos, la ingesta de los grupos Cd fue de aproximadamente de entre 28 y 40% menor respecto a sus controles, diferenciándose significativamente de estos. Respecto a la producción de heces, con excepción del ensayo de verano, que no registró diferencias, los grupos de Cd se caracterizaron por una menor producción de heces, de aproximadamente 16 a 52% respecto a controles paralelos. La Asimilación sigue el comportamiento de ingesta, mostrando un decremento importante en los animales expuestos a Cd de entre el 23 y 40% respecto a sus controles paralelos, siendo el grupo de otoño el que registra las mayores diferencias.

CAPÍTULO 6 RESULTADOS



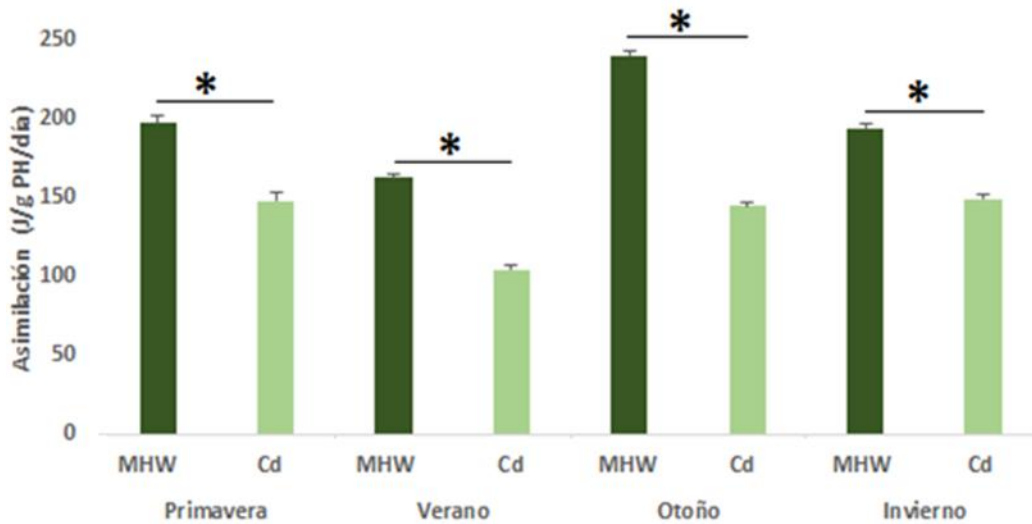


Figura 6.3: Ingesta (I), producción de heces (H) y asimilación del alimento (A) en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o Cd. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control paralelo y el tratamiento intra-ensayo ($P < 0.05$).

Estos resultados ponen en evidencia un claro efecto del cadmio sobre el comportamiento alimentario de los animales expuestos, de reducción de ingesta y asimilación, con el consiguiente déficit en aporte energético/calórico.

Variables Metabólicas a tiempo final de ensayo

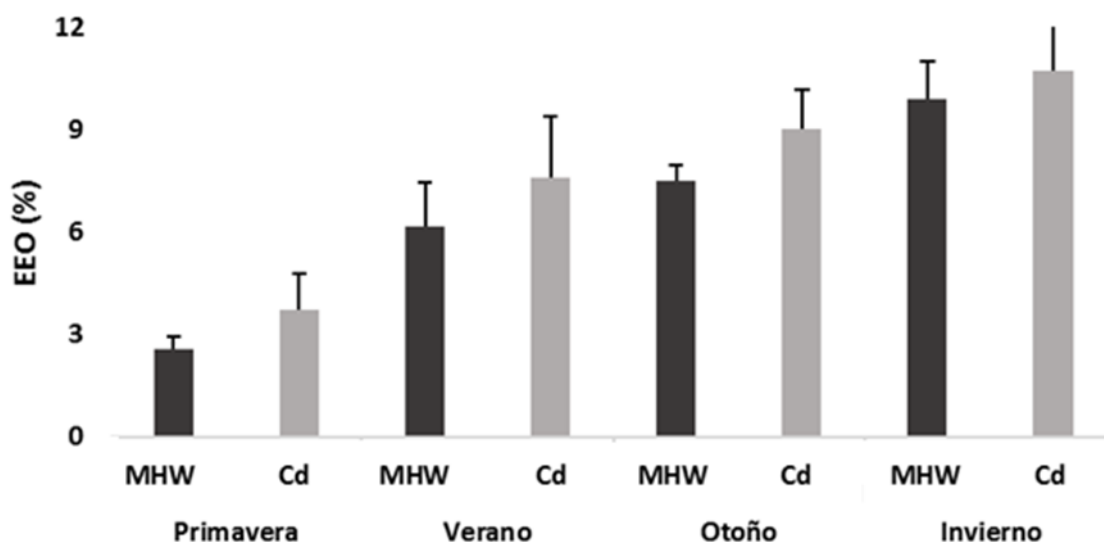
En la Figura 6.4, se muestran los resultados obtenidos luego de 12 días de exposición al medio control -MHW o Cd, de Tasa Metabólica Específica (TME), Eficiencia de Extracción de Oxígeno (EEO%), excreción de amonio (E), Cociente de Amonio (CA) y campo de crecimiento (*SFG*) para los diferentes ensayos estacionales

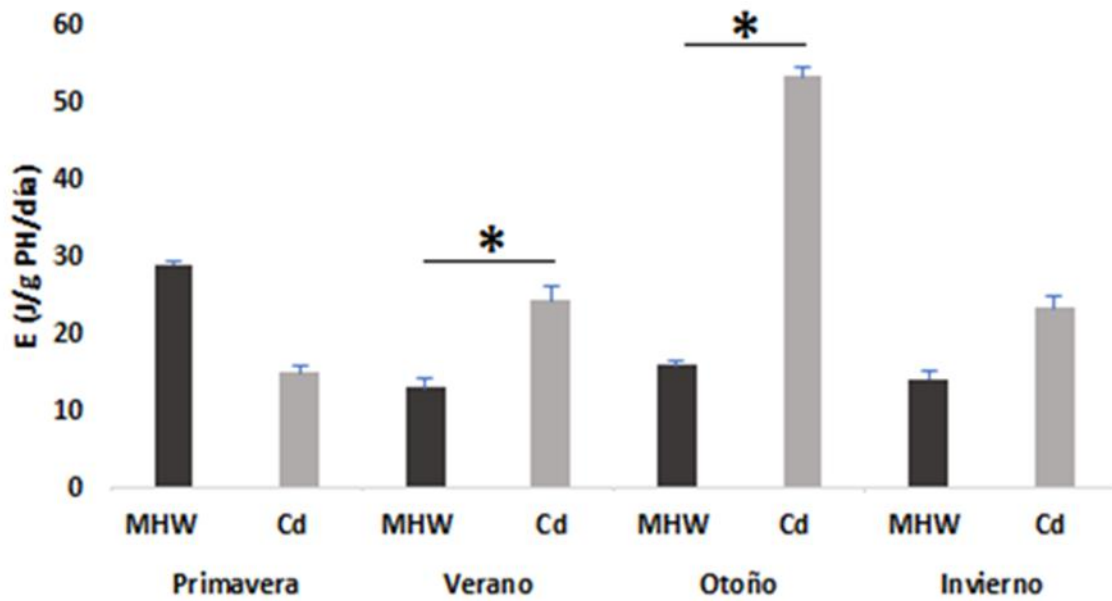
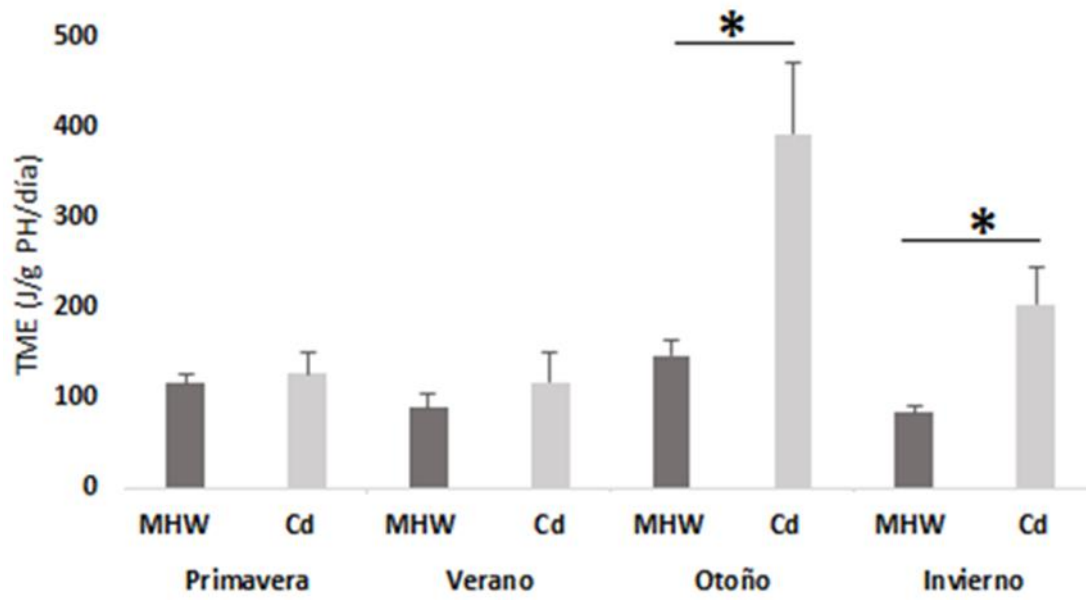
La EEO no mostró un comportamiento diferencial en los grupos expuestos a Cd en ninguno de los ensayos. Respecto a la TME, los animales expuestos a cadmio mostraron

valores mayores a las de sus controles paralelos, pero solo fueron significativamente superiores en los ensayos de otoño e invierno, en ambos casos con valores que duplican los de controles. Este comportamiento de la TME manifiesta un claro efecto estacional “a priori” del Cd, que debe ser interpretada desde una visión integral.

En relación a la excreción de amonio, E, en los grupos expuestos a Cd de los ensayos de verano y particularmente de otoño, se registró un incremento significativo de amonio, que debe interpretarse ligado a TME y CA. El CA, si bien fue mayor en los grupos Cd, no se diferenció de sus controles, por lo tanto, se podría inferir que el catabolismo proteico no sería una variable significativa de aporte energético en los animales expuestos a cadmio.

Por último, el *SFG*, como índice que integra en una ecuación ingreso y egreso de energía a partir de la A, E y TME, da cuenta de las reservas disponibles para el crecimiento (valores positivos), para el mantenimiento homeostático (valores cercanos a cero) o estado de descompensación energética (valores negativos). Los animales expuestos a Cd mostraron valores de *SFG* significativamente menores y siempre negativos, respecto a sus controles paralelos en todos los bioensayos, siendo en el ensayo de otoño el de mayor descenso. Resulta interesante que el *SFG* de controles se incrementa en otoño e invierno respecto a primavera y verano, indicando al otoño en particular como la época del año en que se predice un mayor acumulo de reservas.





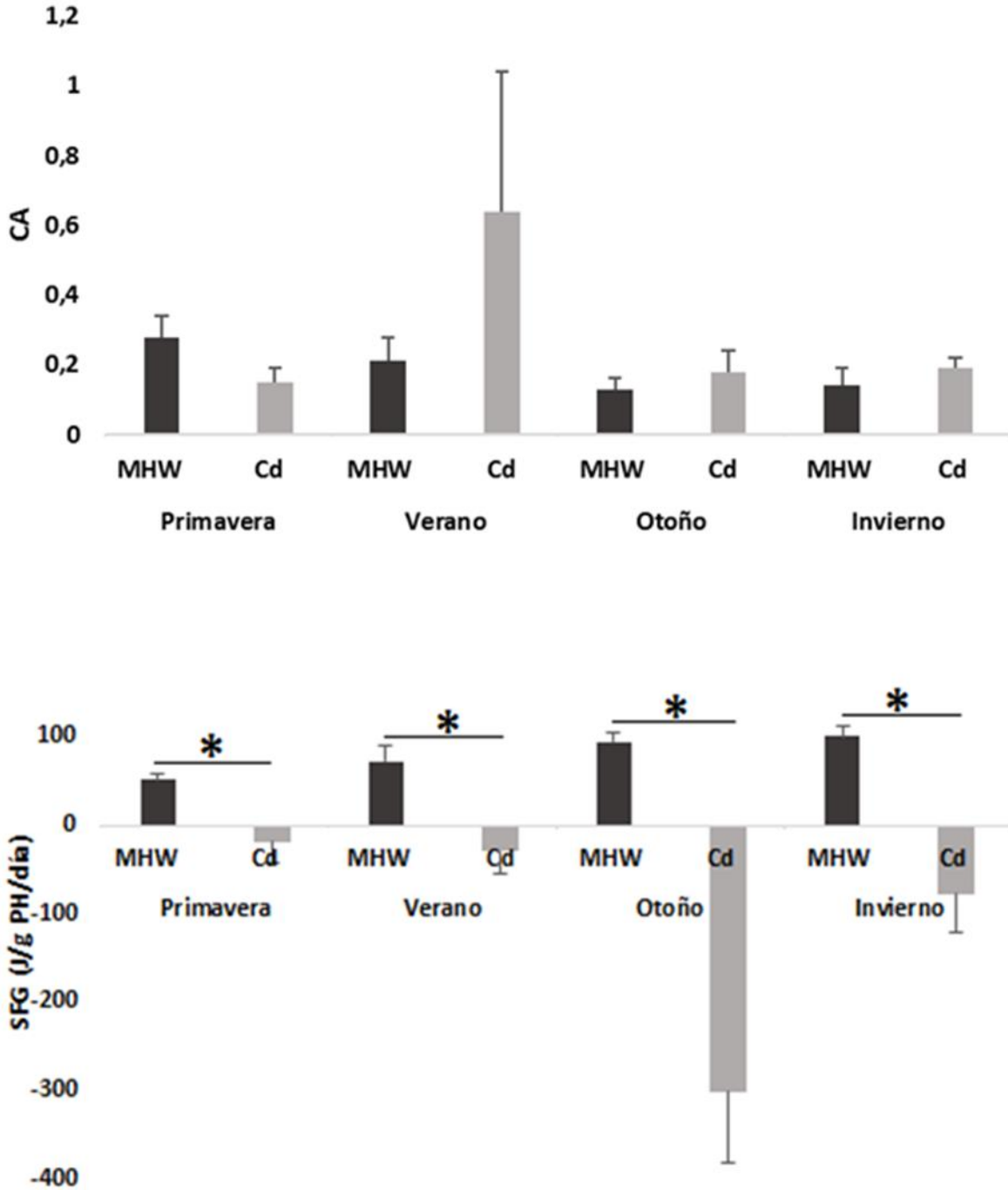


Figura 6.4: Eficiencia de extracción de oxígeno (EEO%), tasa metabólica específica (TME), Excreción de amonio (E), cociente de amonio (CA) y *Scope For Growth* o campo de crecimiento (SFG) en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o medio control positivo utilizando al Cd como tóxico de referencia. Valores medios \pm EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control paralelo y el tratamiento intra-ensayo ($P < 0.05$).

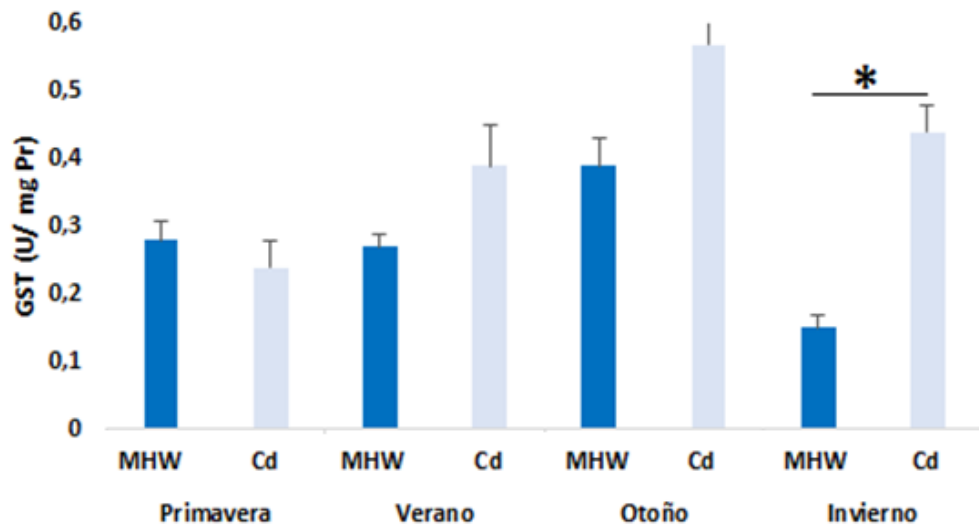
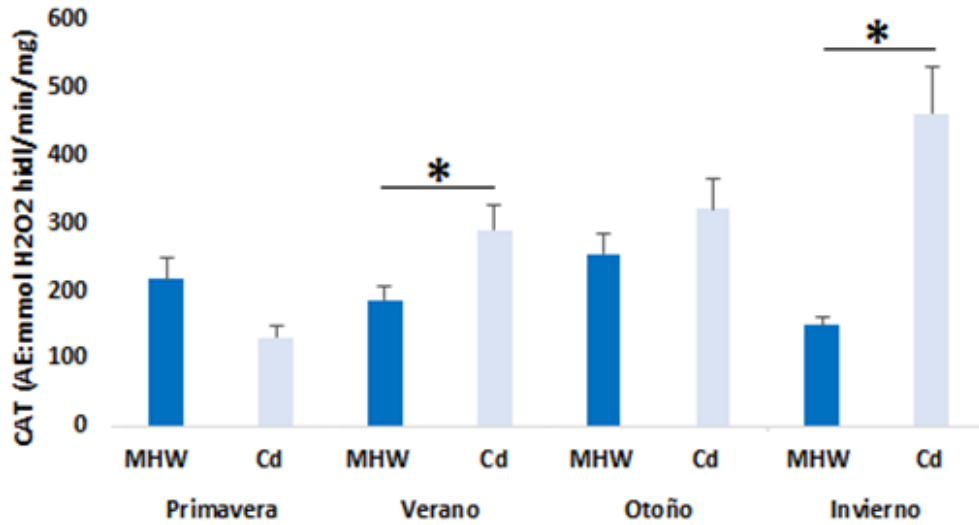
4.3 Variables bioquímicas: Biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos.

La evaluación del daño oxidativo a nivel hepático se cuantificó mediante la actividad específica de las enzimas Catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST) así como el contenido de glutatión reducido (GSH). Para la evaluación de la actividad a nivel nervioso (colinérgico) se midió como parámetro enzimático a la actividad específica de acetilcolinesterasa cerebral (AChE) (Figura 6.5). Todas las determinaciones corresponden a 12 días de exposición a medio control MHW o Cd. La evaluación estadística se efectuó mediante Kruskal Wallis con comparaciones de a pares entre cada grupo expuesto a Cd y su control paralelo en MHW.

En los animales expuestos a Cd, la actividad de CAT hepática se incrementa de manera significativa en los ensayos de verano e invierno. En el caso de la GST hepática se observó el mismo comportamiento que para la CAT, pero aumenta de manera significativa únicamente en el bioensayo de invierno. Por su parte, el contenido de GSH en el hígado mostró un comportamiento irregular: no registro diferencias respecto a controles en primavera, fue significativamente menor en el grupo expuesto a cadmio en el ensayo de otoño, pero incrementó su contenido en los ensayos de verano e invierno. Teniendo en cuenta que el contenido de GSH en medio control mostró menores valores durante el ensayo de invierno (Figura 5.18, capítulo 5), los resultados contrastados con Cd pueden adquirir una mayor significatividad, no obstante, no hay evidencia suficiente para llegar a conclusiones no especulativas.

Por último, la actividad de la AChE cerebral de los animales expuestos a cadmio no mostró diferencias respecto a sus controles paralelos para el bioensayo de primavera, pero fue significativamente menor en el bioensayo de verano y significativamente mayor en el de otoño. En medio control, la AChE cerebral muestra la mayor actividad en verano, por lo tanto, la inhibición de la actividad específica en el grupo Cd podría interpretarse como una alerta de efecto. Cabe resaltar que, si bien todos los biomarcadores

bioquímicos, no registraron diferencias respecto a su control paralelo, durante el ensayo de primavera, ello coincide con un nivel de Cd en solución de 0.45 mg/l en contraste con las mayores concentraciones medidas en los restantes ensayos (0.78, 0.74 y 0.76 mg Cd/l en verano, otoño e invierno respectivamente).



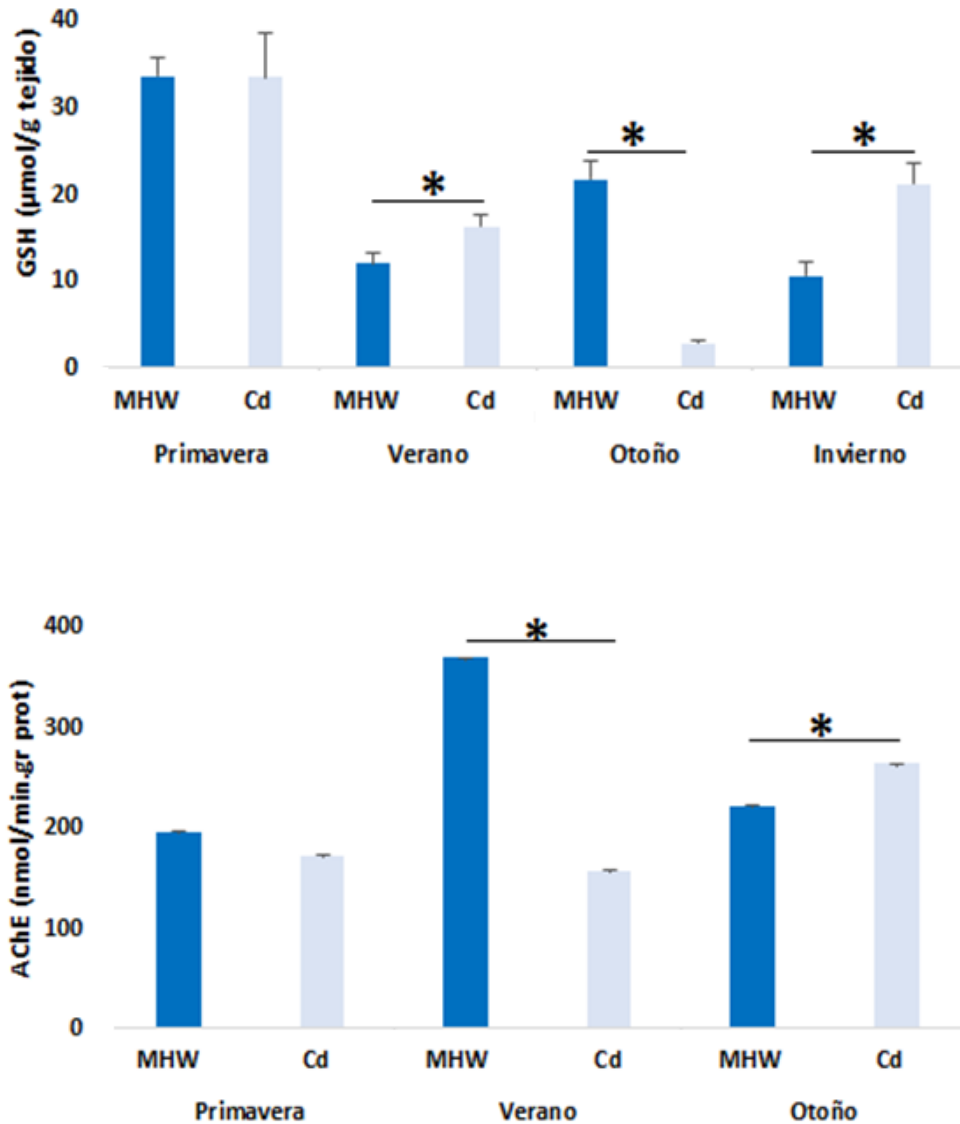


Figura 6.5: Actividad de CAT (AE: $\text{mmoles H}_2\text{O}_2$ hidr/min/mg), GST (U/mg Pr) y contenido de GSH ($\mu\text{mol/g}$ tejido) en hígado y actividad de AChE ($\text{nmol/min}\cdot\text{gr Pr}$) en cerebro de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o Cd. Datos expresados como medias \pm EEM $\dot{\bar{x}}$. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control paralelo y el tratamiento intraensayo ($P < 0.05$).

5 DISCUSION

En este capítulo se evaluó la alteración de un espectro de parámetros de efectos temprano de índole biométricos, metabólicos y bioquímicos en adultos de *C. decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a un medio contaminado con Cd bajo condiciones controladas de laboratorio. El propósito fue profundizar en el conocimiento del efecto de Cadmio, en concentración sub-tóxica, sobre adultos de *C. decemmaculatus* y la sensibilidad de los biomarcadores estudiados para su postulación como posibles *endpoints* en bioensayos ecotoxicológicos de efecto temprano, con cadmio como tóxico referente.

En evaluaciones a nivel ecotoxicológico, la realización de bioensayos estandarizados se torna fundamental debido a la necesidad de realizar comparaciones entre ambientes o regiones. A la hora de estandarizar un bioensayo, es necesaria la protocolización de la metodología, así como también la selección de la especie prueba, el medio de ensayo, los biomarcadores adecuados y el tóxico de referencia, entre otros (García, 2009). Respecto a la especie a utilizar, para la realización de bioensayos estandarizados se requiere que la misma este validada, para lo cual es imprescindible no solo conocer su biología, sino también su respuesta frente a tóxicos referentes bajo un diseño experimental similar al ya normado. La utilización del cadmio (Cd) como compuesto inorgánico para utilizarlo como tóxico de referencia en controles de calidad fue sugerido por varias agencias de protección ambiental (EC, 1990; US-EPA, 1993; 2001). El Cd es uno de los metales más tóxicos para la biota acuática, ya sea disuelto en agua o depositado en los sedimentos, constituyendo una fuente de contaminación para varias cadenas tróficas acuáticas (Espina & Vanegas, 2005; Mebane, 2006; Barhoumi *et al.*, 2009; Rani *et al.*, 2014). Siendo un elemento metálico no esencial para la biota acuática, diferentes estudios han demostrado que en vertebrados expuestos al Cd se detectaron cambios en la actividad natatoria, hipocalcemia, alteración en la morfología de las branquias, aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes y aumento de la frecuencia de micronúcleos (Sloman *et al.*, 2003; De Almeida *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2006; Ferrari *et al.*, 2009; Ossana *et al.*, 2009); En

peces, una vez absorbido, el Cd se transporta por el torrente sanguíneo a las diferentes partes del cuerpo, pudiendo causar deformidades esqueléticas, alteraciones en sistemas enzimáticos, alteraciones del transporte transepitelial y sobre el metabolismo, entre otros efectos (Wright & Welbourn, 1994; Scott & Sloman, 2004; Eissa, 2008).

En la actualidad existe una tendencia a nivel regional para evaluar el impacto de contaminantes sobre los ambientes acuáticos mediante el uso de especies nativas (Ferrari *et al.*, 1998; de la Torre *et al.*, 2005, 2007; Ossana, 2011, 2016, 2019). El uso de juveniles de *C. decemmaculatus* en bioensayos de letalidad ya se encuentra normado (IRAM, 2008). El uso de Cd como tóxico referente en este tipo de ensayos fue propuesto por Matrangelo y Ferrari (2013). Por otra parte, si bien los adultos de *C. decemmaculatus* son frecuentemente utilizados en bioensayos de exposición a distintos tóxicos tanto por periodos cortos como prolongados, en campo y en laboratorio, desde hace tiempo, no se ha indagado aún en la protocolización de ensayos de evaluación de efecto temprano para fines de monitoreo con ellos.

El efecto por exposición al Cd sobre biomarcadores bioquímicos y biométricos en peces es abundante (Ferrari *et al.*, 2011; Eissa, 2010; Pi *et al.*, 2016; Ossana, 2016, 2019), no así sobre biomarcadores ecofisiológicos. Pueden citarse varios estudios realizados con adultos y juveniles de teleósteos en experimentos con concentraciones crónicas o agudas de Cd, que demostraron efectos adversos en diferentes biomarcadores fisiológicos y enzimáticos (Ferrari *et al.*, 2011; Peles *et al.*, 2012; Vergilio *et al.*, 2014; Morales Cazan & Klerks, 2015). En este estudio se informan por primera vez parámetros de índole ecofisiológica como *endpoints* de efecto tóxico por Cd, en bioensayo de efecto temprano protocolizado para adultos de *C. decemmaculatus*, los que se adicionan a los índices biométricos y biomarcadores bioquímicos ampliamente utilizados. Así, y en vista que la postulación de un tóxico para su uso como referente, se basa en la caracterización de su efecto en la especie de ensayo, se espera contribuir a la validación del Cd como tóxico referente en bioensayos de monitoreo sobre la base de sus efectos sobre parámetros biométricos, bioenergéticos y bioquímicos en adultos de *C. decemmaculatus* en condiciones controladas de laboratorio.

Las concentraciones del Cd en los medios de exposición, fueron constantes a través de todo el período que comprendió cada ensayo pudiéndose asumir así, que las diferencias obtenidas entre controles y expuestos al Cd, sobre los biomarcadores estudiados, se deben exclusivamente a los efectos provocados por el metal.

En relación a los parámetros biométricos, se observó que el FC disminuye en los animales expuestos. El FC, como índice de masa corporal, es un indicador del estado de salud general del animal y es usualmente utilizado como una primera aproximación para evaluar el efecto de los tóxicos sobre la condición general de los animales expuestos (Smolders *et al.*, 2002; Schlenk *et al.*, 2008). En peces, la respuesta del FC es variable y dependiente de la especie, condición inicial y del ensayo, la disponibilidad de alimento y el tiempo de exposición, entre otros factores. Adultos de *C. decemmaculatus* expuestos a 2 mg Cd/l MHW durante cuatro días no registraron cambios en el FC (Ossana *et al.*, 2016). Este resultado sería esperable considerando que en un periodo inicial normalmente los animales se encuentran en proceso de compensación aguda. Por otro lado, Bonifacio *et al.* (2017) reportan valores de FC disminuidos en adultos expuestos por 42 días a *chlorpyrifos* y *oglyphosato*, los que avalarían la hipótesis de una respuesta lenta del FC en esta especie.

Otros índices, denominados órgano-somáticos, proveen una información más específica al relacionar la masa de un órgano en particular con la masa corporal del individuo, pudiendo mostrar una correspondencia más directa del efecto ejercido por un tóxico debido a la exposición en dicho órgano (Menendez-Helman, 2013). Así, el índice hepato-somático (IHS) es un biomarcador más específico que el FC, ya que está relacionado directamente con la toxicidad ocurrente en el hígado y con la importancia que este órgano tiene en el almacenamiento de glucógeno como reservas energéticas. Debido a ello, un menor valor de este índice podría indicar un detrimento de las reservas debido al gasto energético necesario que ocurre a consecuencia de una exposición estresante a causa de un tóxico, mientras que un aumento del IHS podría indicar sucesos patológicos como una hipertrofia o hiperplasia de los hepatocitos (Goede & Barton, 1990; Bonifacio, 2017). En nuestro caso, los animales expuestos a Cd mostraron valores de IHS menores (con

excepción del bioensayo de primavera) que los controles paralelos respectivos, pudiendo derivar los sucesos patológicos nombrados anteriormente en procesos necróticos los cuales explicarían también este descenso significativo en los valores de IHS. Ferrari *et al.* (2010) han presentado resultados en donde no se obtuvieron diferencias de los IHS sobre ejemplares de *Cyprinus carpio* expuestos a medio control y a una concentración de 0.15 mg Cd/l de agua dechlorada luego de 14 días de exposición, aludiendo al tiempo de exposición, aunque dejando claro que el hígado se ve comprometido por la presencia del metal. Otros resultados, también realizados en *C. carpio* expuestos a concentraciones de 0.5 y 2 mg Cd/l, mostraron diferencias estadísticas significativas no solo en el IHS sino además en el FC en comparación con sus controles luego de 2-4 semanas de exposición (de la Torre 2001; Ferrari *et al.*, 2006). El tiempo de exposición es una variable que debe analizarse con cautela, ya que, aun asumiendo condiciones experimentales comparables, un mismo *endpoint* puede mostrar muy diferentes respuestas dependiendo si su registro es tomado a tiempo corto, mediano o extenso de exposición, indudablemente ligado a las fases consecutivas del proceso de adaptación general de alarma, resistencia y agotamiento (Selye, 1956), así como los niveles umbrales de las diferentes etapas.

Respecto al índice Gónado-somático, los grupos expuestos al Cd presentaron, en los tres bioensayos en los que fue considerado, valores menores que los registrados para los individuos control, significativo solo para el ensayo de invierno. Respecto a este índice y teniendo en cuenta las particularidades del ciclo reproductivo de *C. decemmaculatus*, que aporta una gran variabilidad en las masas ováricas, estos resultados deben ser cuidadosamente considerados y asociados al estado madurativo del ovario para una correcta interpretación. En la tilapia de Mozambique, *Oreochromis mossambicus*, se vio que los metales pesados como el Cd son capaces de promover el crecimiento e inducir una temprana maduración, mientras que en ejemplares adultos puede atrofiar tanto las gónadas en ambos sexos, así como también distorsionar su función (Amutha, 2013). Si bien especulativo, se podría suponer como causa de la tendencia a menores masas ováricas de IGS el efecto del Cd sobre el estado madurativo de los ovarios, y nuevos estudios deben ser realizados para confirmarlo.

En los organismos, el crecimiento implica un desbalance neto de energía entre la que es incorporada a través de la ingesta del alimento, la energía utilizada en los procesos metabólicos y la pérdida en la producción de heces y excreción de amonio. Por lo tanto, en el crecimiento son de suma importancia los procesos fisiológicos como la digestión, la A, la respiración y E, y cualquier sustancia que interfiera en ellos. Los biomarcadores metabólicos estudiados, pusieron en evidencia que los grupos expuestos al Cd de los cuatro ensayos, se alimentaron significativamente menos que sus controles paralelos (Figura 6-3). También, la H fue significativamente menor en todos los casos con excepción del ensayo de verano, donde si bien fue menor no llegó a diferenciarse de su control. Teniendo en cuenta estos dos parámetros, la A del alimento fue significativamente menor para todos los casos en los grupos expuestos (ver anexo). Los bajos valores obtenidos de A en los grupos expuestos a Cd, podrían ser el resultado de un efecto indirecto en el comportamiento alimentario de los peces, de reducción de la I diaria. Debe considerarse que la reducción de la I es un efecto que se observa desde el comienzo de la exposición y no muestra variaciones en función del tiempo de exposición (ver análisis de regresión en Anexo). Ferrarier *al.* (2011) reportaron respuestas similares en juveniles de *Cyprinus carpio* expuestos a 0.15 mg Cd/l. Otros estudios realizados en perca (*Perca flavescens*) expuestas a aguas de lagos de Canadá contaminadas con Cd y otros metales pesados mostraron que también reducían su ingesta y crecimiento, entre otros parámetros, debido a la exposición a estos xenobióticos (Couture & Rajender Kumar, 2003).

Los peces tienen excelentes sentidos de la vista y olfato y un exclusivo sistema de la línea lateral, que con gran sensibilidad detecta corrientes de agua y vibraciones proporcionando un tacto a distancia en el agua (Hickman, 2009). Es bien conocido que los metales como el Cd, Hg, Zn, Cr y Cu son fuertes inhibidores de la quimio-recepción (cuyos receptores están localizados principalmente dentro y alrededor de la boca, incluidas las barbelas y también en aletas y tronco) y los receptores de olfacción que se encuentra contenido en las cámaras olfatorias, en las narinas. Los metales disueltos en el medio pueden interactuar con neuronas olfatorias como si fuesen olores (Tierney *et al.*, 2010). Del mismo modo, las células sensoriales del sistema de la línea lateral, células sensoriales pilosas sobre la

superficie apical de los peces (sectores laterales del cuerpo), que se encuentra en constante contacto con el medio externo, podrían ser inhibidas por la exposición al Cd (Baker & Montgomery, 2001). El comportamiento alimenticio en peces estaría influenciado tanto por factores externos (condiciones ambientales, hora del día, estaciones climáticas, etc) como por factores internos (glucemia, hormonas como la insulina y leptina) (Volkoff 2005, 2009; Hoskins & Volkoff, 2012), por lo que la exposición al Cd podría encontrarse interfiriendo en la captación del alimento, reduciendo el apetito de los peces, ello relacionado posiblemente con un impedimento funcional en las neuronas olfatorias.

La tasa metabólica específica (TME) en los grupos expuestos a Cd a tiempo final de exposición, fue mayor que sus controles en todos los bioensayos, siendo su aumento, significativo para los ensayos de otoño e invierno. Esto puede ser interpretado como consecuencia de un aumento en la demanda de energía (Figura 6.4). Una tendencia similar se vio en *C. carpio* expuestos a 0.15 mg Cd/l, (Ferrari *et al.*, 2011). En nuestro estudio, junto con el aumento de la TME también se vio una tendencia a aumentó la eficiencia de extracción de oxígeno (EEO %), aunque no se encontraron diferencias estadísticas significativas respecto a sus controles. La habilidad de los peces para extraer oxígeno del agua bajo condiciones estresantes depende, además de la afinidad del oxígeno por la hemoglobina, del aumentando del flujo de agua a través de las branquias, de la modificación del flujo sanguíneo y de cambios morfológicos de las branquias, como por ejemplo el aumento del número de lamelas secundarias (Zhou *et al.*, 2001), cambios fisiológicos y estrategias adaptativas que favorecen la captación del oxígeno disuelto en el medio para un mayor suplemento a los tejidos. En carpas (*Ctenopharyngodon idella*) se observó que estando expuestas por 96 h a 0.5 mg Cd/l, aumentaban tanto el consumo de oxígeno como la EEO% (Espina *et al.*, 2000), resultados similares a los obtenidos por Ferrari *et al* (2011) en *C. carpio*. Nuestros resultados proveen evidencia de que el aumento en la TME registrado para *C. decemmaculatus*, no puede ser atribuido a un aumento en la toma de oxígeno, por lo que las reservas energéticas podrían verse involucradas.

La cantidad de amonio excretado (E) permite poder evaluar el balance de nitrógeno. Esta es una herramienta importante para determinar los efectos de los factores ambientales y nutricionales sobre el metabolismo proteico (Fournier *et al.*, 2003; Uliano *et al.*, 2010). El amonio es el producto de excreción más importante en peces de agua dulce, representando entre el 80-98 % del total de amonio excretado (De Boeck *et al.*, 1995). La contribución de las proteínas sobre el total de producción de energía en los peces, puede evaluarse mediante el cociente de amonio (CA) que estima la proporción de proteínas involucradas en la respiración (De Boeck *et al.*, 1995; Owen *et al.*, 1998) y claramente representa un índice del catabolismo proteico. En nuestro trabajo y respecto a los grupos expuestos al Cd, no se vieron diferencias en el CA, mientras que la E se vio aumentada de manera estadísticamente significativa en los bioensayos de verano y otoño (Figura 6.4). De todas formas, las variaciones en la E deben también considerarse relacionadas no solo con variaciones del metabolismo proteico sino también como resultante de daño del epitelio branquial (Ossana *et al.*, 2019) y/o actividad de transaminasas hepáticas. Las transaminasas, alanina transferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), se encuentran en gran proporción en el hígado y son utilizadas como biomarcadores sensibles de hepatotoxicidad y cambios histopatológicos (Begum, 2005; Borges *et al.*, 2007), formando un grupo de enzimas que catalizan el intercambio de grupos α ceto-ácidos por grupos amino (van der Oost *et al.*, 2003), función indispensable para la síntesis o degradación de proteínas. Ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a muestras de agua provenientes de la localidad de San Francisco (tramo medio del Río Reconquista), mostraron valores aumentados de ALT respecto a los controles en agua declorada del grifo, conjuntamente con un aumento del IHS (de la Torre *et al.*, 2007). Como se puede ver, el nivel del amonio excretado utilizado como biomarcador no resulta unívoco pudiendo llevar a interpretaciones erróneas. El *Scope For Growth* (SFG) o campo de crecimiento, es un índice integrador de parámetros fisiológicos; básicamente es una ecuación del balance energético definido como la incorporación de energía a través de la A menos la energía perdida por la TME y la E y representa la energía disponible para el crecimiento y la reproducción de un individuo luego de todas las demandas fisiológicas

ocurridas a partir de la E y la TME (Scarlet, 2015). Es un indicador directo de la calidad ambiental en relación al mantenimiento del balance energético positivo y consecuentemente sobre la capacidad del crecimiento, supervivencia y reproducción de los organismos (Widdows & Donkin, 1991). Varios factores pueden influenciarlo, tal es el caso de la disponibilidad y calidad del alimento, la temperatura o la presencia de contaminantes en el medio. En nuestro estudio, todos los grupos expuestos a Cd mostraron un descenso significativo del SFG (en comparación a sus controles paralelos, siendo el bioensayo de otoño el de mayor diferencia, probablemente debido al comportamiento estacional que presentó este biomarcador durante esta época. Como se muestra en la Figura 6.4, los valores medios obtenidos de SFG para los grupos de Cd fueron negativos, indicando un claro desbalance energético entre energía incorporada a través del alimento y energía consumida. El SFG provee así, un *endpoint* cuantitativo rápido del estatus energético del animal y del estatus de crecimiento. En otros trabajos, se han reportado una reducción del SFG debido al estrés sufrido por hipoxia en *C. carpio* principalmente por un descenso de la eficiencia de la asimilación (Zhou *et al.*, 2001), sugiriendo que este marcador es sensible y representativo del estatus metabólico de peces. En otro estudio también realizado en carpas, se obtuvo una disminución significativa del SFG en ejemplares expuestos a 0.3 mg/l Cd al cabo de 4 días de exposición, señalando que el Cd es un factor perturbador del balance energético global de los peces (Eissa, 2008). El SFG parece ser un biomarcador muy sensible para ensayos toxicológicos con Cd en diferentes grupos de animales como gasterópodos marinos (*Nassarius festivus*) y teleósteos (*C. carpio*) (Wo *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2011).

Regular la producción de radicales libres y mantener la homeóstasis redox, se torna esencial para el buen funcionamiento fisiológico de los organismos. Pero durante los procesos metabólicos, una parte pequeña de los radicales libres puede “escaparse” de los mecanismos de defensas antioxidantes, causando daño oxidativo a componentes celulares (Valavanidis *et al.*, 2006). Debido a las fluctuaciones de los niveles de estrés oxidativo a los que están sometidos por el ambiente, los organismos pueden ser capaces de adaptarse a estos cambios por síntesis adicional de enzimas antioxidantes que puedan

regular el daño oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2006). En los animales acuáticos, la exposición a diferentes factores estresantes, entre los que se encuentran los xenobióticos presentes en los cuerpos de agua, pueden perturbar los procesos de defensas antioxidantes. Así, los organismos acuáticos pueden servir como modelos para la investigación de procesos de daño celular y protección frente a radicales libres, así como también las consecuencias a nivel fisiológico, como enfermedades y envejecimiento (Lushchak, 2011).

Por su parte, la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) es utilizada en varios ensayos ecotoxicológicos como marcador de neurotoxicidad (Bradbury *et al.*, 2008). Se la adopta como biomarcadora de alteraciones ocurridas en las uniones parasinápticas ocurridas en el sistema nervioso central colinérgicas, neuromusculares y simpáticas, pudiendo afectar la locomoción y el equilibrio de los animales (vanDyk & Pletschke, 2011).

Analizando los biomarcadores bioquímicos determinados en este estudio (Figura 6.5), los resultados fueron variables para los distintos bioensayos. Mientras que en el ensayo de primavera la actividad de AChE cerebral de los animales expuestos a Cd, con valores medios menores en aproximadamente un 14% respecto del control paralelo, no alcanzó a diferenciarse de este, en el ensayo de verano el grupo expuesto disminuyó la actividad AChE en un 40% y en otoño la incrementó en un 15%. Teniendo en consideración el comportamiento sinusoidal de esta enzima a lo largo del año, con picos de mayor actividad en la temporada cálida y descensos marcados durante la época fría (Mendendez-Helman, 2013,) que además fue corroborado en este estudio (Ver capítulo 5), los resultados obtenidos para el grupo expuesto a Cd podrían indicar un efecto de disfunción sobre el ciclo circanual de la enzima. Indudablemente, si bien no totalmente, la variabilidad en los niveles de actividad intra e inter ensayos también se pueden explicar, en parte por otros factores. Así, algunos autores destacan la gran variabilidad espacio temporal de la actividad AChE cerebral que existe en trabajos realizados en *Morone saxatilis* con diferentes clases de plaguicidas organofosforados (Duriex *et al.*, 2010), y la sensibilidad de la actividad de AChE a parámetros tales como el sexo, la talla o la temperatura ambiental es (Beauvais, 2002).

Si bien los sistemas enzimáticos y no enzimáticos son esenciales para la conversión de especies reactivas del oxígeno en metabolitos más inofensivos y restaurar el normal metabolismo celular, no existe una regla general que indique que ante un aumento de la concentración de un xenobiótico se induzca la actividad enzimática (Bonifacio et al., 2016). En este trabajo, la actividad de las enzimas presentes en la defensa antioxidante (Tabla 5.7), como CAT y GST, así como también el contenido de GSH, medidas en el hígado, también mostraron variabilidad tanto intra como inter-ensayos. En los animales expuestos a Cd, la actividad de CAT, se vio aumentada respecto a sus controles paralelos de forma significativa en los bioensayos de verano e invierno con incrementos medios porcentuales entre un 55 y 200 % respectivamente. En el ensayo de otoño, si bien no alcanzó a diferenciarse, el grupo de Cd mostró una actividad media un 25% por encima de su control, en tanto que en el ensayo de primavera no se diferenció. Debe considerarse que en este último ensayo la concentración de Cd fue algo menor que en los otros tres (ver Tabla 4.3). La actividad de GST, mostró un comportamiento bastante similar a CAT, pero solo significativamente mayor que en control en el ensayo de invierno. Por su parte, el contenido de GSH fue significativamente mayor en los animales expuestos a Cd en los bioensayos de verano e invierno, y significativamente menor para el bioensayo de otoño, estación en la cual los controles muestran valores mayores. Esto podría deberse a una mayor síntesis de GSH para contrarrestar el efecto del Cd durante las estaciones de verano e invierno; el caso del menor valor de GSH obtenido para el otoño podría deberse a que durante esa época, la energía metabólica se utiliza principalmente en mayores requerimientos energéticos para el crecimiento y reproducción de los organismos (ver Capítulo 5), lo que explicaría la mayor deficiencia del contenido de GSH en esa época. GSH es un péptido muy abundante en el hígado, y se piensa que es la primera línea de defensa contra la hepatotoxicidad del Cd (Rani *et al.*, 2014). Sin embargo y contradictoriamente, Ossana *et al.* (2016), en ensayos de exposición a 96 h con 2 mg/l de Cd utilizando *C. decemmaculatus*, midiendo en el sector medio del animal (que incluye el hígado) no obtuvo diferencias de CAT y GST respecto al control, pero si obtuvo un descenso significativo del contenido de GSH medido en el sector medio y en el sector anterior (que

incluye las branquias). De todas, maneras, hay que considerar que este trabajo citado fue realizado con una concentración de Cd aproximadamente 4 veces mayor a la utilizada en esta tesis, lo que podría justificar la falta de GSH por encontrarse ahora en menor proporción respecto a la catálisis de metabolización del metal.

6 CONCLUSIONES

A continuación, se escriben las principales conclusiones obtenidas para resultados de la exposición por 12 días de adultos de *C. decemmaculatus*, a Cd en medio control en un rango de concentraciones de 0.4 a 0.8 mg/l, respecto al control en MHW bajo las condiciones experimentales. Si bien existe una importante variabilidad individual para los distintos biomarcadores estudiados, bajo las condiciones experimentales establecidas, los adultos de *C. decemmaculatus* demostraron ser sensibles al Cd para varios de los *endpoints* considerados:

-Si bien no siempre se registraron diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles paralelos, entre los parámetros biométricos es esperable que el FC, así como el IHS y el IGS se vean disminuidos. Los índices órgano-somáticos y el FC se ven afectados por el estrés que genera la exposición al metal, más notorio durante la época fría durante las que algunos parámetros evidenciaron un comportamiento estacional, discutido en el Capítulo 5. El FC es un biomarcador útil para bioensayos con Cd, mostrando ser sensible a en el rango de concentraciones ensayadas (0.46- 0.78 mg Cd/l).

-La respuesta metabólica de los animales debe ser analizada de manera integrada, siendo el SFG un índice adecuado a tal fin. Se puntúan debajo las principales conclusiones de los parámetros metabólicos individuales medidos:

-El Cd muestra un claro efecto sobre el comportamiento alimentario de los animales expuestos, de reducción de ingesta, producción de heces debido al ingreso de menor

alimento, y asimilación de este, con el consiguiente déficit en aporte calórico que luego repercute negativamente al integrarlo en la ecuación del SFG, siendo la diferencia más notoria de la A respecto al control MHW durante la época del otoño, debido al comportamiento estacional. Se considera que este comportamiento de alimentación es un punto que deber considerarse para la planificación de los bioensayos.

-Respecto a la TME, si bien en los animales expuestos a cadmio fue mayor que las de sus controles paralelos, solo fue significativamente superior en los ensayos de otoño e invierno. Este comportamiento de la TME manifiesta un claro efecto estacional “a priori” del Cd, donde las reservas energéticas se ven comprometidas, produciéndose el aumento de la TME, durante la época fría. Por otra parte, la EEO% no muestra alteraciones, en tanto que, si bien la E se incrementó en los ensayos de verano y otoño, el CA no registró efecto como consecuencia de la exposición a Cd, por lo tanto, se asume que el catabolismo proteico no contribuye significativamente a incrementar el aporte energético en los animales expuestos a cadmio.

-Los animales expuestos a Cd mostraron valores de SFG significativamente menores y siempre negativos, respecto a sus controles paralelos en todos los bioensayos, siendo en el ensayo de otoño el de mayor descenso. Resulta interesante que el SFG de controles en MHW se incrementa en otoño e invierno respecto a primavera y verano, indicando al otoño en particular como la época del año en que se predice un mayor acumulo de reservas. Esto repercute en las mayores diferencias encontradas entre tratamientos control y expuestos a Cd para el SFG (y en varios biomarcadores como ya se vio) por el marcado comportamiento estacional que presenta este índice.

-Entre los biomarcadores bioquímicos, la actividad de la AChE cerebral de los animales expuestos a Cd no mostró diferencias respecto a sus controles paralelos para el bioensayo de primavera, pero fue significativamente menor en el bioensayo de verano y significativamente mayor en el de otoño. Considerando que, en medio control la AChE muestra la mayor actividad en verano por su comportamiento circanual, la inhibición de su actividad específica en el grupo Cd demuestra una alerta de efecto a causa del metal.

-Entre los biomarcadores de estrés oxidativo en hígado la actividad de la CAT y GST muestran un comportamiento similar siendo mayor en los ensayos de verano e invierno (CAT) y solo en invierno (GST). Por su parte, el contenido de GSH muestra un comportamiento irregular. Estos resultados ponen en evidencia la necesidad de integrar la información de biomarcadores bioquímicos. El comportamiento de las defensas enzimáticas contra el estrés oxidativo parece responder dependiendo de muchas variables, como pueden ser el tamaño de los animales, la concentración y tipo de tóxico, el tiempo de exposición, la variabilidad génica de respuesta del biomarcador por parte de los organismos, etc, por lo que su uso es de interpretación dificultosa por lo cual su integración mediante índices puede resultar favorable para una explicación conjunta de las respuestas bioquímicas.

-Los resultados obtenidos permiten llegar a la conclusión que el Cd en concentraciones sub-tóxicas de 0.5 a 0.8 mg/l resulta un tóxico adecuado para su uso como tóxico de referencia /control positivo para emplear en bioensayos de efecto temprano con *Cnesterodon decemmaculatus* como especie bioindicadora.

CAPÍTULO 7

Evaluación del efecto de la exposición a aguas receptoras del río Reconquista sobre adultos de *C. decemmaculatus* en laboratorio

1 INTRODUCCIÓN

El creciente impacto de las actividades humanas sobre los cuerpos de agua genera la necesidad de comprender, conocer y proceder sobre los factores y procesos que provocan la contaminación. Así, es importante establecer programas de monitoreo para su seguimiento, y medidas de saneamiento y remediación adaptadas a las características particulares de los distintos ecosistemas. En este contexto son muchos los aspectos y variables que deben considerarse y que, a grandes rasgos, pueden agruparse en dos grandes áreas: económico-políticas y desarrollo científico-técnico, ambas profusamente interconectadas.

Respecto a los aspectos científico-técnicos, los programas de monitoreo de aguas continentales incluyen análisis de la calidad de aguas y sedimentos, tanto desde la cuantificación de variables fisicoquímicas como del impacto de la calidad del agua y/o sedimentos sobre la biota. La información obtenida, biológica y no biológica, debe ser repetida periódicamente y analizada en conjunto y es por ello que, entre otras razones, es fundamental contar con protocolos de procedimiento estandarizados.

En particular, la respuesta de la biota al deterioro de la calidad del agua, evaluada mediante la realización de bioensayos estandarizados de letalidad, está ampliamente documentada a nivel internacional y también nacional, con la inclusión en los últimos años, de especies nativas en las normativas. Sin embargo, la letalidad es una respuesta demasiado tardía para programar acciones de remediación y control. Uno de los desafíos

actuales, sobre el que esta tesis pretende realizar un aporte, es diseñar bioensayos de efecto temprano con especies representativas de las cuencas hidrográficas objeto de monitoreo y que sean reproducibles. En este sentido tanto el uso de diferentes biomarcadores como la selección y sensibilidad del organismo prueba resultan cruciales.

Como ya fuera mencionado en la introducción (Capítulo 1) el río Reconquista es uno de los más contaminados del país. Su deterioro se incrementa aguas abajo, mostrando niveles de contaminación leve en las nacientes del río hasta contaminación séptica-cloacal luego de la afluencia del arroyo Morón en el tramo medio (Salibián, 2006; Vilches, 2012; Ferrari, 2015).

El sitio de muestreo del agua del río para la obtención de las muestras ambientales que se utilizan en este capítulo se encuentra en las nacientes del cauce principal del río, luego de la Represa Roggero. La misma funciona como un sistema depurador disminuyendo la carga del material particulado en suspensión y el procesamiento de los nutrientes que ingresan desde los arroyos La Choza, Durazno y la Horqueta (Momo *et al.*, 2003; Sadañowski, 2003; Rigacci *et al.*, 2013; Basilico, 2014). La selección de éste sitio se fundamenta en que, sus aguas fueron determinadas previamente como de contaminación leve, además en ensayos de exposición sus aguas, evidenciaron efectos genotóxicos en *C. decemmaculatus* (Ossana, 2016), desordenes bioquímicos en renacuajos (*Lithobates catesbeianus*) (Ossana, 2013), siendo además *C. decemmaculatus* usualmente una especie con poblaciones naturales en esa zona del río.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO

La Hipótesis específica que se pone a prueba es que la especie *C. decemmaculatus* expuesta en condiciones de laboratorio a estrés ambiental por exposición al agua del río Reconquista, responde a sus efectos mediante la alteración de un espectro amplio de parámetros bioquímicos, biométricos y fisiológicos que alteran algunas de las funciones básicas de los individuos y su *fitness*.

El objetivo es poder identificar aquellos biomarcadores significativamente sensibles respecto a los controles, en individuos adultos de *C. decemmaculatus* expuestos a aguas receptoras provenientes del cauce principal del río Reconquista con grado de polución leve.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

De igual modo que en el capítulo 6, para el análisis de los resultados, las respuestas biológicas seleccionadas de los grupos expuestos a las muestras ambientales (RR) luego de 12 días de permanencia en condiciones experimentales, se compararon con las de los controles paralelos en MHW, los ya analizados para establecer líneas de base de los distintos *endpoints* (Capítulo 5).

En el cuadro siguiente se indica la composición de los grupos a analizar (N= 112)

Ensayo	Control MHW	Agua del Río Reconquista
Primavera	10 machos y 9 hembras	9 machos y 1 hembras
Verano	15 hembras y 3 machos	10 hembras
Otoño	21 hembras y 1 macho	1 macho y 14 hembras
Invierno	14 hembras y 1 macho	2 machos y 11 hembras

Medios utilizados:

-Control negativo, medio MHW (agua moderadamente dura).

-Cuatro muestras ambientales de agua proveniente de las nacientes del río Reconquista (RR) tomadas en cada una de las estaciones climáticas (primavera, verano, otoño e invierno), centrifugadas (5 min a 10000 rpm), aireación constante hasta alcanzar una concentración normal de OD (9 mg O₂/l medio) y conservadas en frío (5°C) previo a su uso.

En ocasión de la toma de las muestras, se realizó su caracterización fisicoquímica, se determinó el contenido de metales y plaguicidas como se indica en el Capítulo 2

(Materiales y métodos) y se calcularon dos índices químicos de calidad del agua, ICAP1 e ICAB, información ya discutida en el Capítulo 4. La renovación del medio (2 l) se realizó cada 96 h y las mediciones físicoquímicas de cada réplica se hicieron antes y después de cada renovación (1-4 días).

En los animales se analizaron las mismas variables ya indicadas en los capítulos 5 y 6, las que son agrupadas en tres categorías:

- 1) Biométricas: peso corporal, talla, Factor de Condición (FC) e índice Hepato-somático (IHS); Con excepción del ensayo de primavera, también se calculó el Índice Gónado-somático en hembras (IGS).
- 2) Balance energético: Ingesta (I), heces (H) y asimilación específica (A); Tasa metabólica específica (TME); Eficiencia de extracción de oxígeno (EEO%); Excreción de amonio (E); Cociente de amonio (CA); Campo de Crecimiento o *Scope For Growth* (SFG).
- 3) Bioquímicas: actividad de la Acetilcolinesterasa cerebral (AChE); Catalasa (CAT), Glutathion S-Transferasa (GST), contenido de Glutathion reducido (GSH) en el hígado.

Para el análisis de los resultados de cada uno de los ensayos se evaluó RR vs MHW mediante análisis de Kruskal Wallis con comparaciones de a pares utilizando el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

4 RESULTADOS

Los resultados referentes a la físico-química de las muestras ambientales y los valores medios de los parámetros físico-químicos registrados en las distintas réplicas de cada tratamiento y bioensayo se mostraron en el Capítulo 4, Tabla 4.1 y 4.2 respectivamente.

En relación a la mortalidad media acumulada, como también se indicó previamente en el Capítulo 4, a tiempo final de exposición los grupos RR no se diferenciaron de los controles,

salvo en el ensayo de verano que registró una mortalidad media de aproximadamente 17% (Figura 4.1). Estos valores nos permiten afirmar que, bajo las condiciones experimentales las muestras de agua del río Reconquista no afectan de manera significativa la sobrevivencia de los animales.

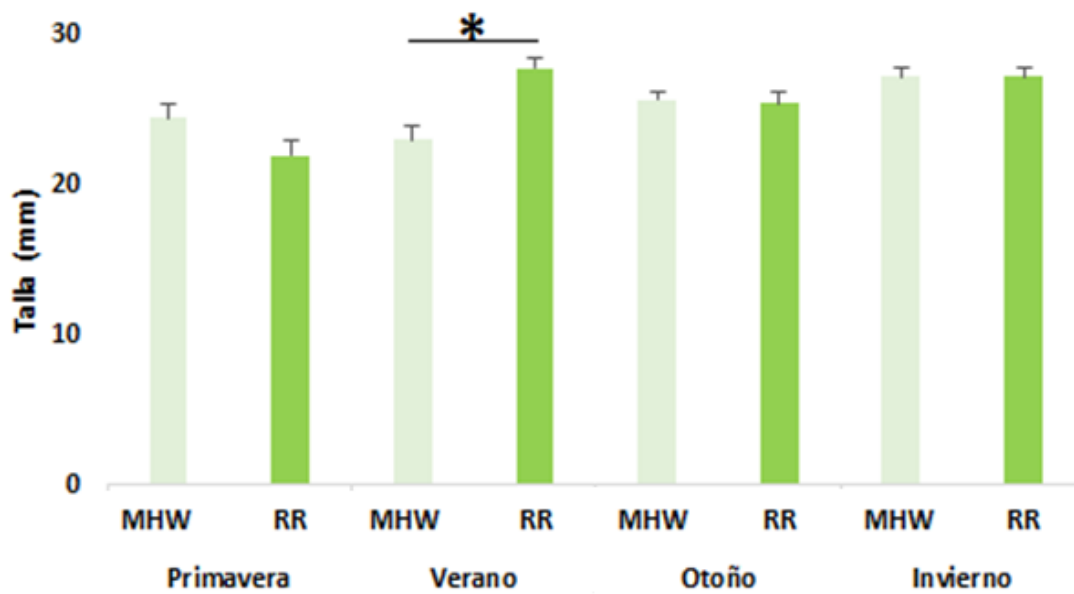
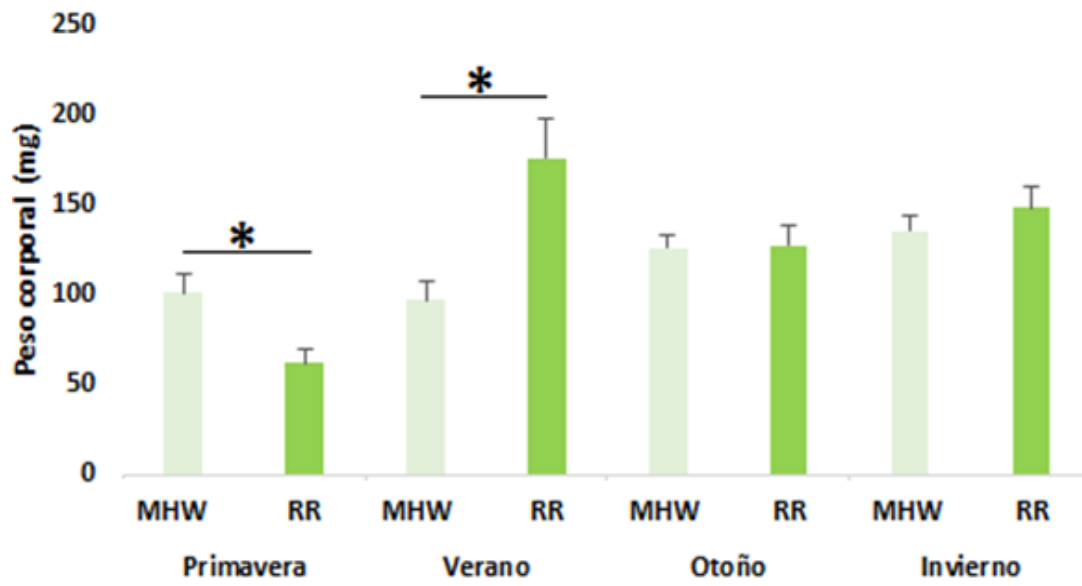
A continuación, se presentan los resultados obtenidos para los biomarcadores analizados diariamente y a tiempo final de exposición.

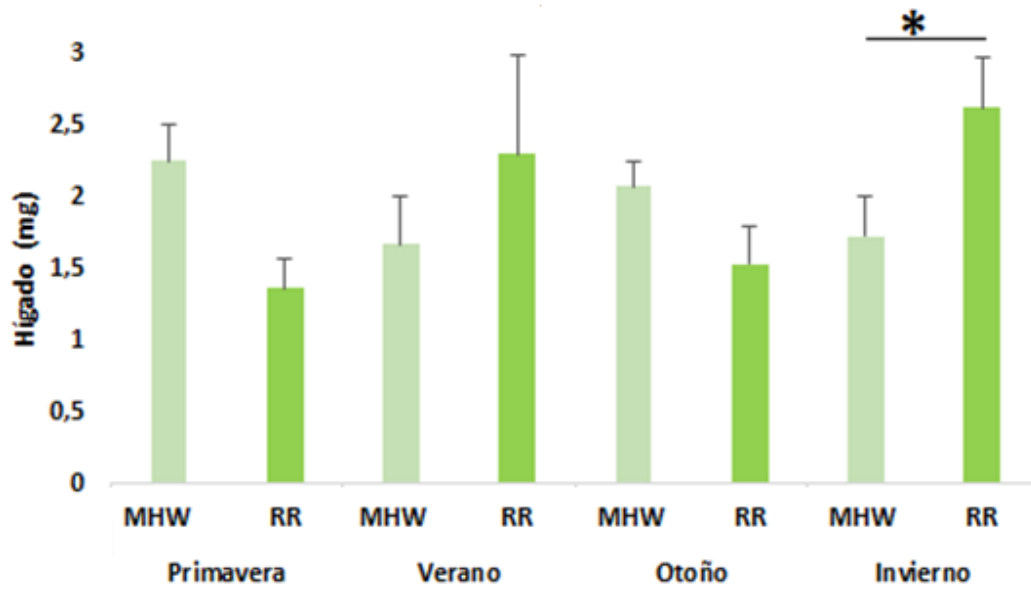
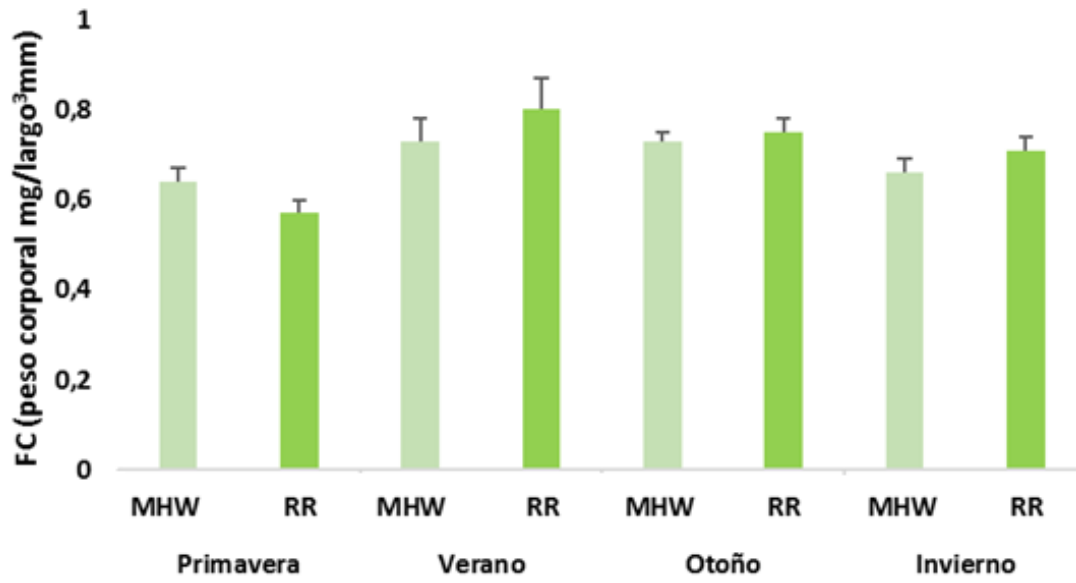
4.1 Variables Biométricas

En la Figura 7.1 se muestran los valores medios para Talla, Peso corporal, Factor de Condición (FC), peso del hígado e índice hepato-somático (IHS) de adultos de *C. decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional a tiempo final de exposición en medio control -MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista (RR). Los resultados estadísticos descriptivos se muestran en el anexo correspondiente

Se puede apreciar que el peso corporal de los animales expuestos a RR resultó significativamente menor, y mayor en relación al control paralelo, en los ensayos de primavera y verano respectivamente. En el ensayo de verano, la talla también fue mayor para el grupo RR. No obstante, el FC no se diferenció de controles en ninguno de los cuatro bioensayos.

Si bien los pesos de los hígados fueron significativamente mayores en el grupo RR respecto a MHW en el bioensayo de invierno, muestran una gran variabilidad dentro de cada grupo y el IHS de los animales expuestos a RR no se diferencia de controles en ningún caso.





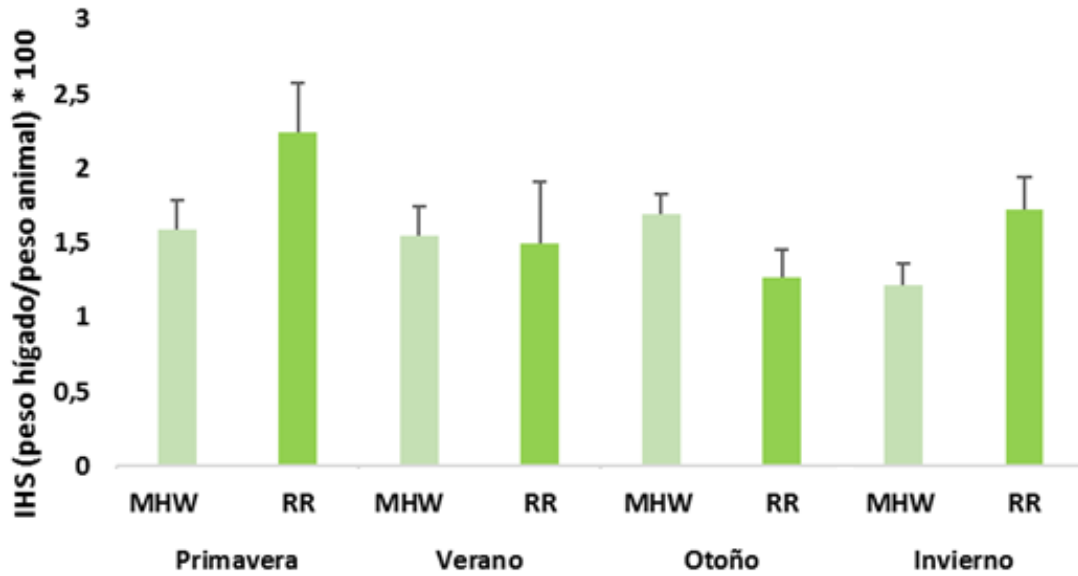


Figura 7.1: Talla, Peso corporal, Factor de Condición (FC), peso del hígado e índice hepato-somático (IHS) de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control paralelo y el tratamiento intra-ensayo ($P < 0.05$).

En cuanto al peso del ovario e índice Gónado-Somático de las hembras (IGS), como se observa en la Figura 7.2 el grupo expuesto a RR en el ensayo invierno mostro valores que prácticamente triplican los de su control paralelo y se encuentran por encima del rango esperable para controles (Tabla 5.2, Capítulo 5).

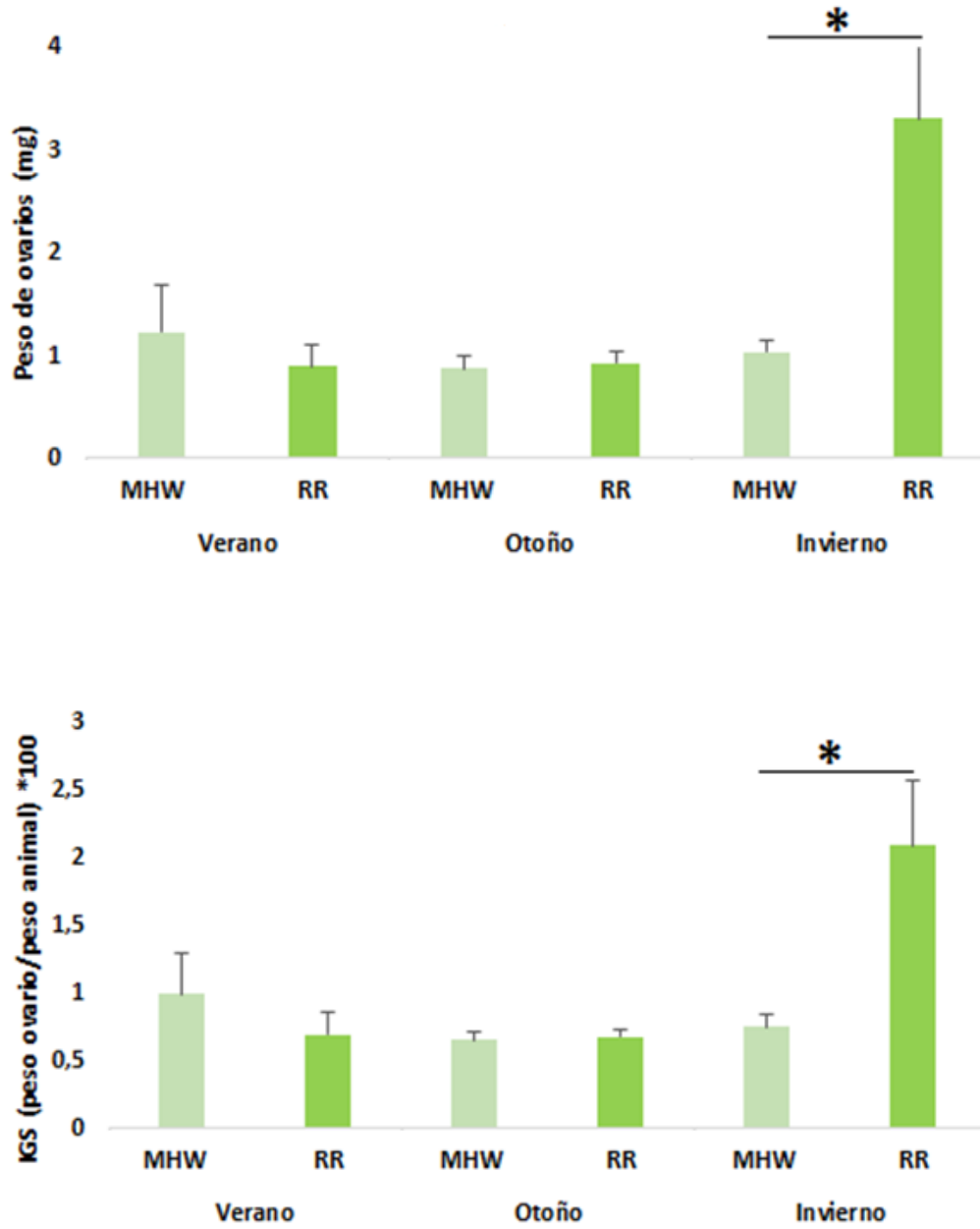


Figura 7.2: peso de ovarios e índice gónado-somático (IGS) de hembras adultas de *C. decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control paralelo y el tratamiento intra-ensayo ($P < 0.05$).

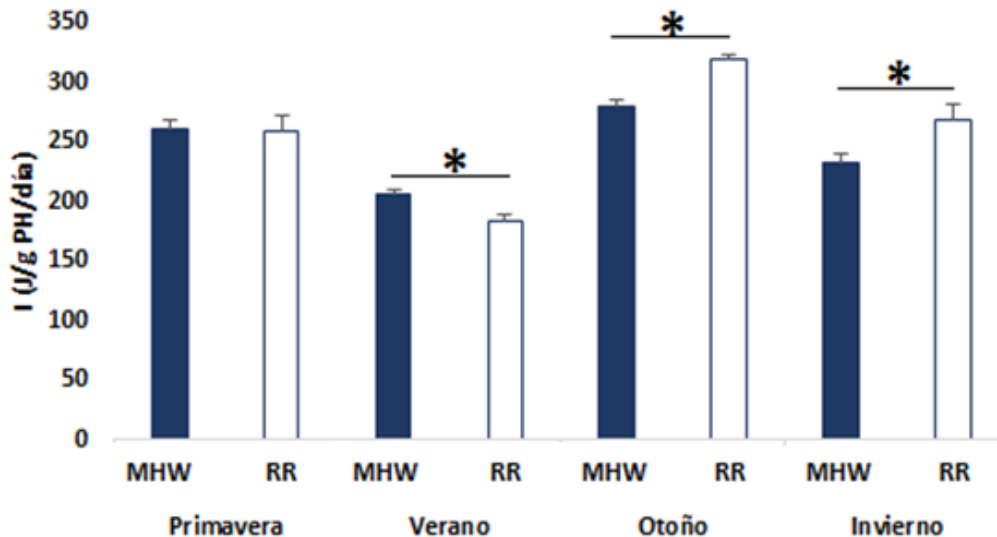
4.2 Variables del Metabolismo Energético

Comportamiento y Eficiencia Alimentaria (variables de registro diario).

Ingesta (I), heces (H) y asimilación específica (A).

En la Figura 7.3 se muestran los valores medios para I, H y A (J/g PH/día) de los grupos RR y MHW de los cuatro ensayos.

Centrando el análisis en el contraste de RR vs MHW se observa que la respuesta de la I fue variable entre ensayos, en tanto que la H fue siempre mayor para los grupos RR. La A resultante en RR fue significativamente menor, con excepción del bioensayo de invierno. Respecto a este, durante el desarrollo del mismo lamentablemente se perdió una de las réplicas de RR y algunos registros de I o H debieron ser eliminados por errores de procedimiento, motivo por el cual el número es menor y en consecuencia los resultados de los parámetros de registro diario deben ser considerados con cautela.



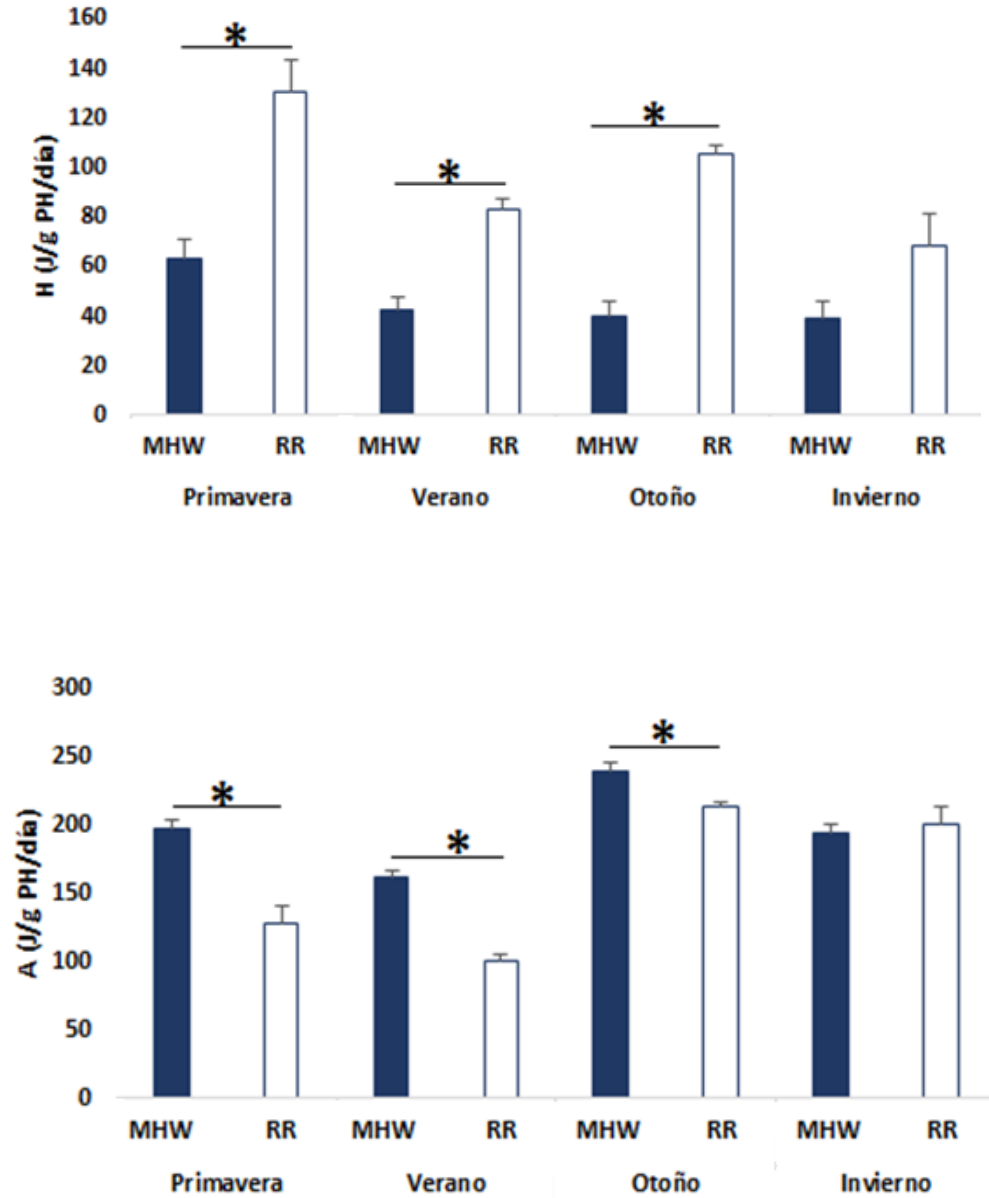


Figura 7.3: Ingesta (I), producción de heces (H) y asimilación del alimento (A) (J/g/PH/día) en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional expuestos por 12 días a medio control -MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR. Los asteriscos indican diferencias significativas entre RR vs su control paralelo intra-ensayo (P<0.05).

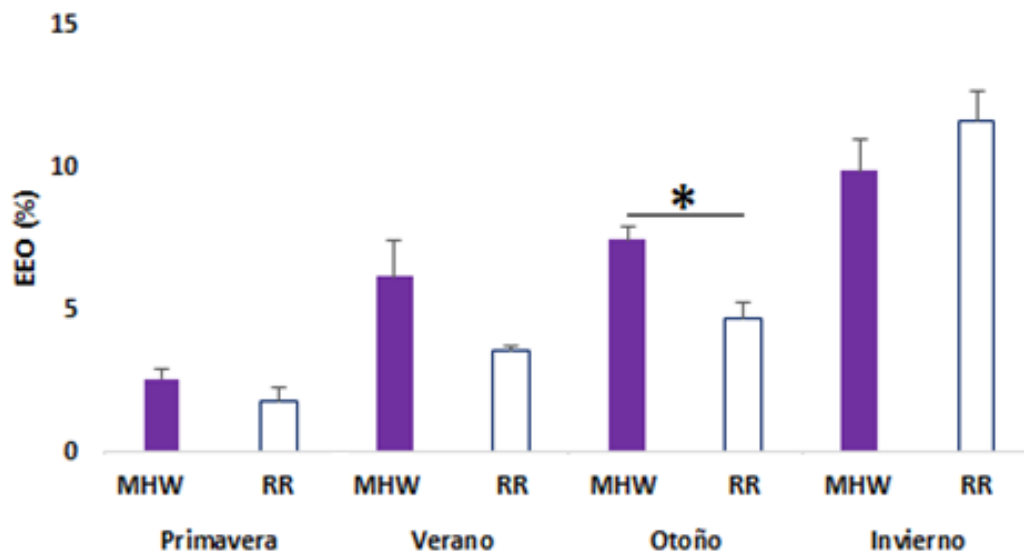
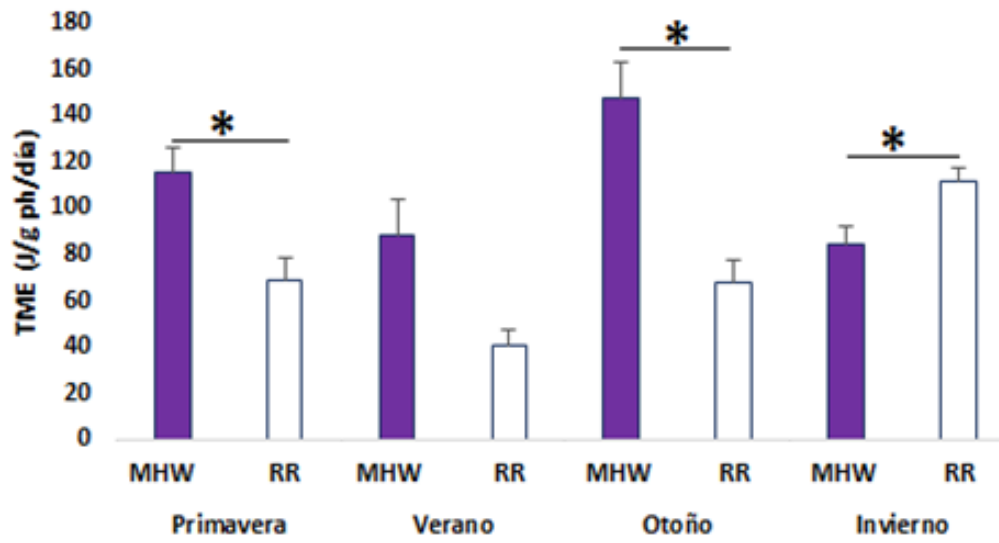
Variables Metabólicas a tiempo final de ensayo

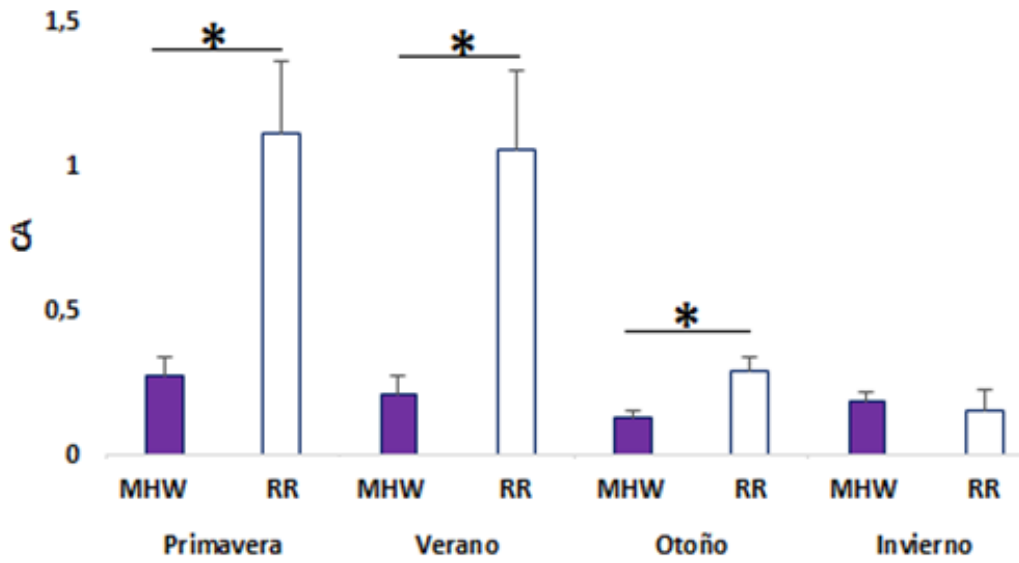
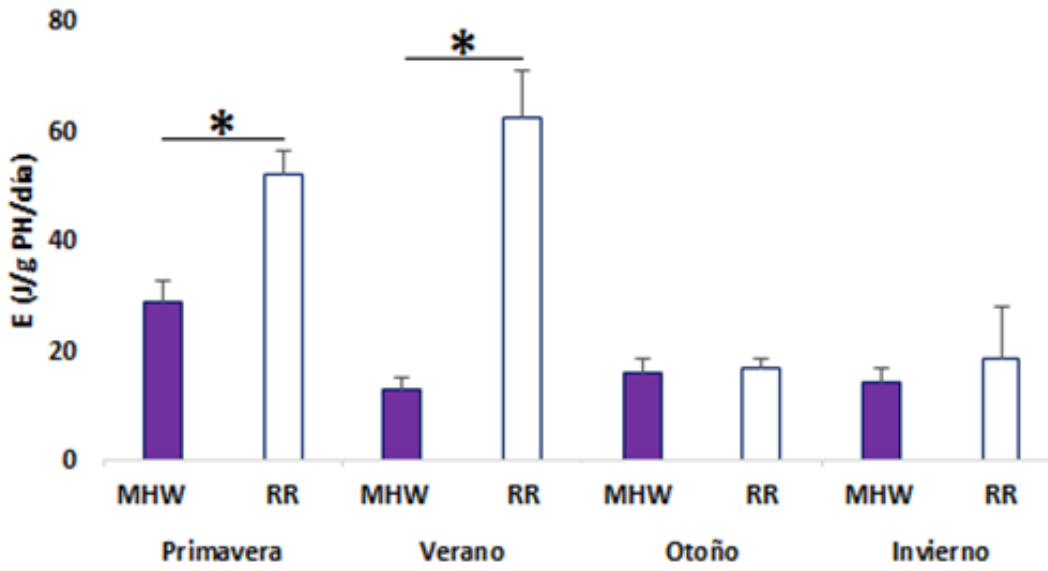
En la Figura 7.4 se muestran los valores medios a tiempo final de exposición de Tasa Metabólica Específica (TME), Eficiencia de Extracción de Oxígeno (EEO%), excreción de amonio (E), Cociente de Amonio (CA) y campo de crecimiento (SFG) para MHW y RR de los cuatro bioensayos.

La TME fue significativamente menor, en el orden del 50% en el grupo RR para los bioensayos primavera, verano, otoño, y significativamente mayor en el bioensayo de invierno (35% aproximadamente). Por otro lado, la EEO, salvo en el bioensayo de otoño, 60% menor, no se diferencia de los controles. El comportamiento de la EEO en MHW parece indicar que su valor se incrementa de primavera a invierno. El grupo RR sigue la misma tendencia.

Por otra parte, la excreción del amonio (E) en aquellos ejemplares expuestos a RR, fue notablemente mayor que sus controles en primavera y verano, y no se diferenció de ellos en otoño e invierno. En tanto que el CA siguió prácticamente el mismo comportamiento que la E y, si bien en menor proporción, alcanza a ser significativamente mayor también en otoño. Para la interpretación de estos resultados se debe considerar la respuesta de la asimilación del grupo RR, menor que controles.

El SFG con excepción del ensayo de otoño muestra una clara tendencia a ser menor en el grupo RR respecto a los controles, siendo significativo el bioensayo de primavera.





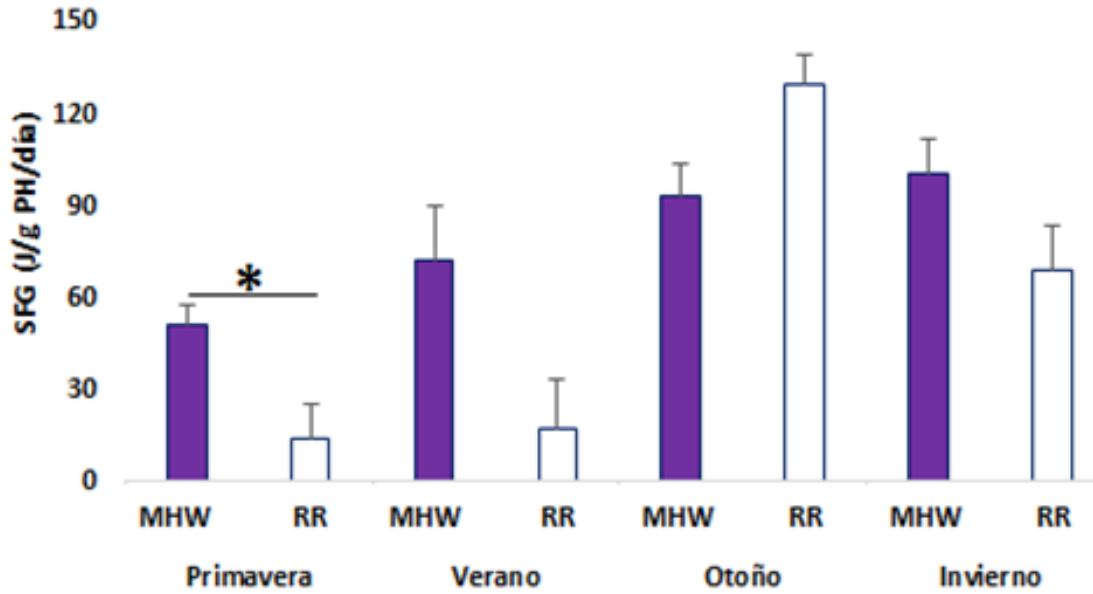


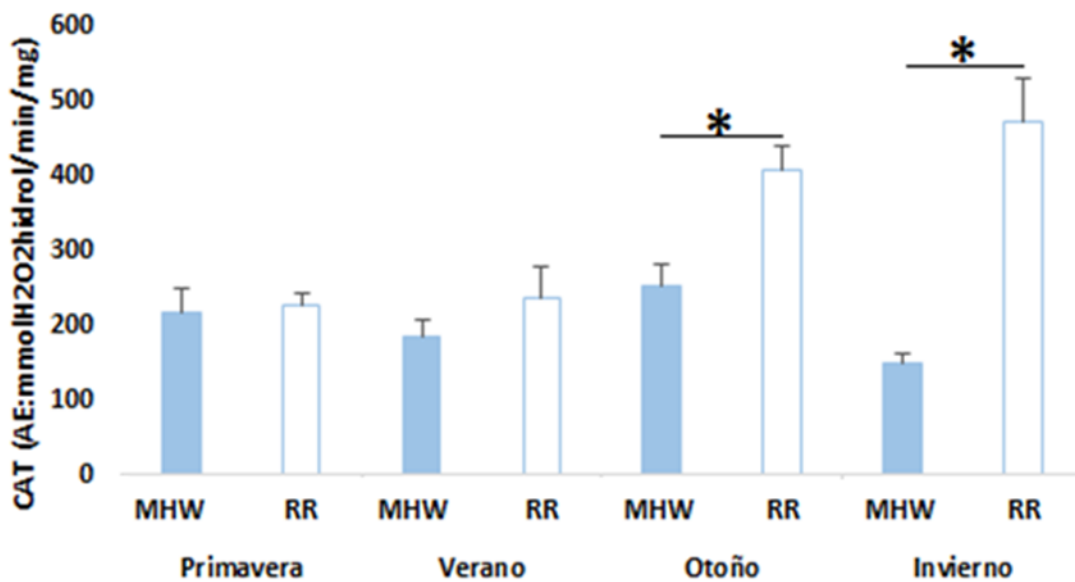
Figura 7.4: Valores medios \pm EES para tasa metabólica específica (TME), Eficiencia de extracción de oxígeno (EEO%), Excreción de amonio (E), cociente de amonio (CA) y Scope For Growth (SFG) en adultos de *C. decemmaculatus* correspondientes a los cuatro ensayos luego de 12 días de exposición a medio control - MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control paralelo y el tratamiento intra-ensayo ($P < 0.05$).

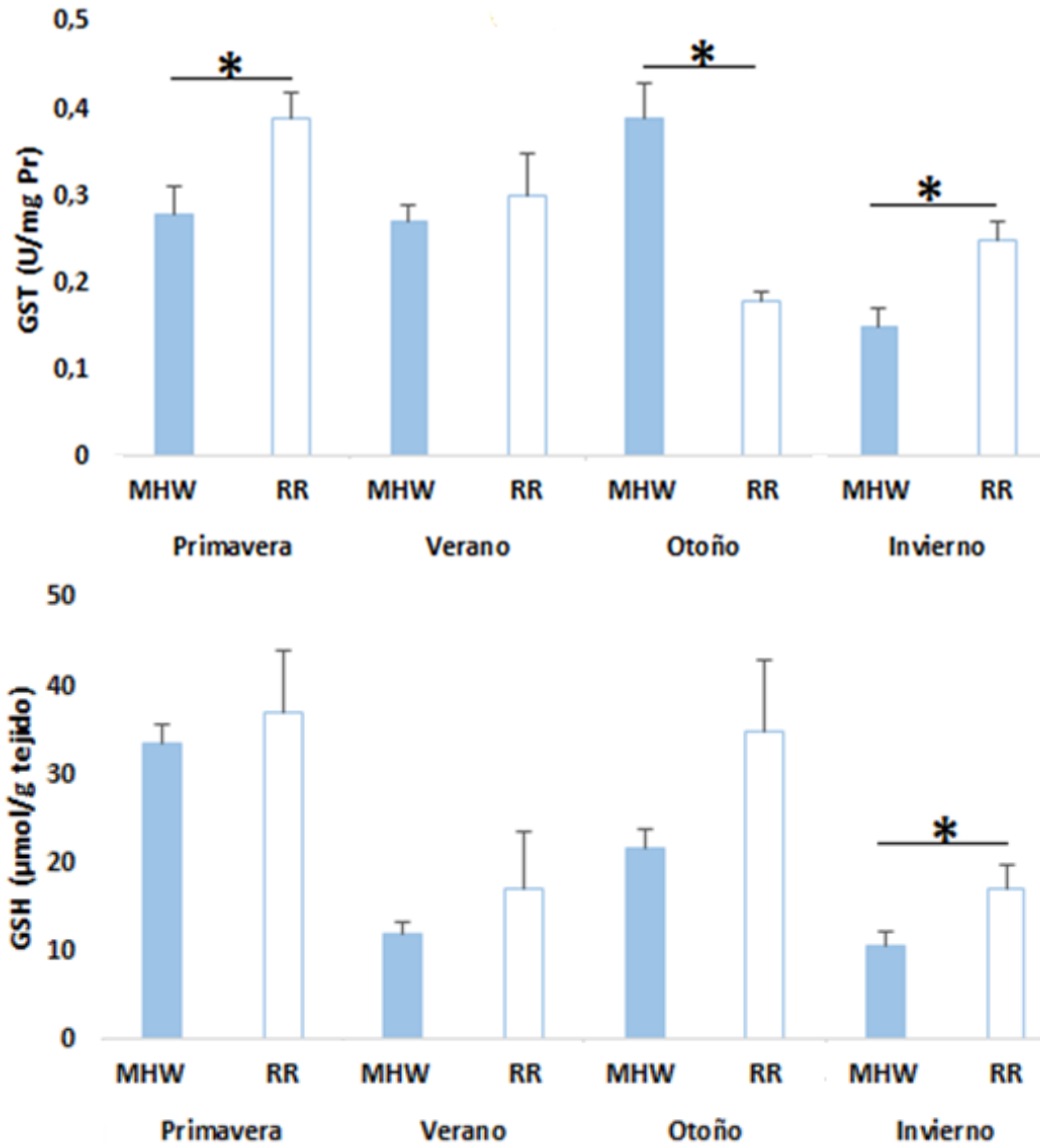
4.3 Variables bioquímicas: Biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos.

En cada ejemplar, se midió la actividad específica de la enzima Catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST) así como el contenido de glutatión reducido (GSH) en el hígado. En el cerebro se midió la actividad específica acetilcolinesterasa (AChE), con excepción del bioensayo de invierno en donde no fue registrada (por un error metodológico). Se contrastaron diferencias estadísticas dentro de cada ensayo grupo expuesto al agua del río (RR) respecto a su control paralelo - MHW. En la figura 7.5 se exponen los valores medios y errores estándar de cada grupo a tiempo final de exposición:

La actividad de CAT fue mayor en todos los grupos RR para los cuatro bioensayos, siendo significativo este aumento para los bioensayos de otoño e invierno, en tanto que la actividad de la GST mostró comportamientos irregulares, siendo significativamente mayor

en los grupos RR para para los ensayos de primavera e invierno, y significativamente menor para el otoño. Vale recordar que la GST mostró un comportamiento estacional con mayor actividad en otoño (Capitulo 5). Si bien el contenido de GSH para todos los grupos RR de los cuatro ensayos fue mayor que su control paralelo, únicamente en invierno se obtuvo un aumento significativo respecto a este, contrariamente al descenso estacional que se había obtenido en los controles para la misma estación (Capitulo 5). Por último, la actividad enzimática de AChE, la cual presentaba mayores valores para la época de verano en los ejemplares del grupo control, en los grupos RR fue significativamente menor durante este bioensayo y significativamente mayor para la primavera y el otoño.





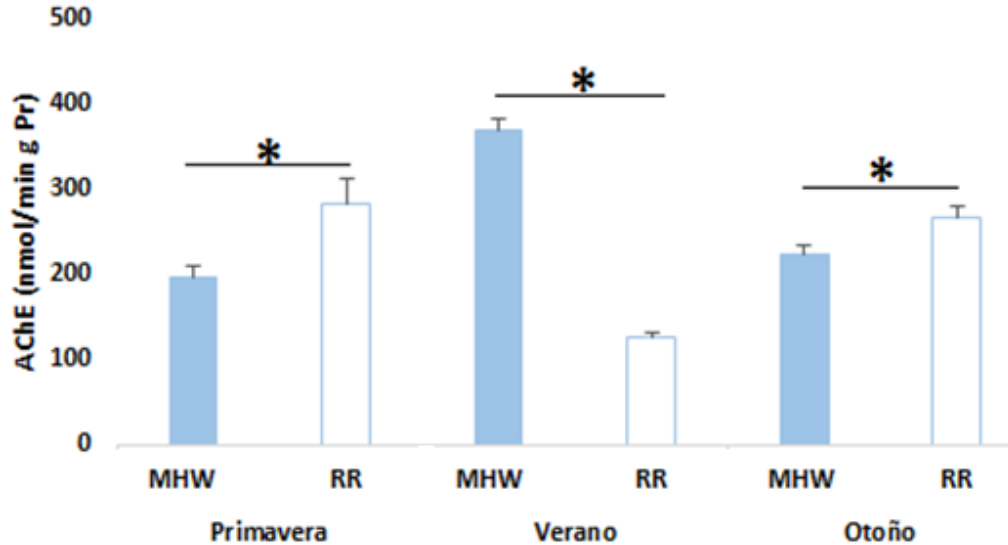


Figura 7.5: Actividad de CAT (AE:mmoles H₂O₂ hidr/min/mg), GST (U/mg Pr), contenido de GSH (μmol/g tejido) en hígado y actividad de AChE (nmol/min g Pr) en cerebro de adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional luego de 12 días de exposición a medio control -MHW o a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control paralelo y el tratamiento intra-ensayo (P<0.05).

5 DISCUSION

En este capítulo se evaluó la respuesta de un amplio espectro de parámetros biométricos, metabólicos y bioquímicos en adultos de *C. decemmaculatus*, expuestos a muestras de agua de las nacientes del río Reconquista. Los resultados fueron analizados de manera individual y agrupados en índices.

La fisicoquímica de las muestras ambientales fue discutida en Capítulo 4. En la Tabla 4.1 se muestran los valores registrados de todos los parámetros medidos y la estimación de calidad del agua mediante los índices, ICAB e ICAPÍ.

Tomando éstos índices se pudo ordenar la calidad del agua de menor a mayor nivel de contaminación de acuerdo a ICAB: primavera (8.8)=otoño (8.8) < verano (8.6) = invierno (8.6) y, de acuerdo a ICAPÍ: primavera (8.2) < verano (7.0) < invierno (6.7) < otoño (6.3). Los

metales que se encuentran por encima de los niveles guía (Subsecretaría de recursos hídricos de la Nación) son principalmente As y Cu y en menor medida Pb y Cr (verano e invierno) y en la muestra de primavera, Cu (en valores muy por encima de los permitidos) Zn y Pb. Respecto al Cu parece ser un metal habitualmente presente, ya que, para el mismo sitio de muestreo fue detectado en concentraciones elevadas con anterioridad (Ossana *et al.*, 2016). Ambos índices de calidad del agua indicaron que el sitio de muestreo estaba ligeramente contaminado, en coincidencia con los resultados reportados por otros autores (Ossana, 2011; Rigacci *et al.*, 2013; Ossana *et al.*, 2016). Por su parte, los valores de los parámetros fisicoquímicos monitoreados durante los ensayos fueron comparables a los medidos en el sitio de muestreo, en el cual habita una población natural de *C. decemmaculatus* (ver tabla 4.2).

En ninguna de las muestras de agua usadas en los ensayos se registraron valores detectables de plaguicidas. En este sentido se debe tener en cuenta, por un lado, que el sitio de colecta del agua se encuentra a la salida de la represa Roggero/lago San Francisco, de importante caudal y que funciona como depuradora de descargas orgánicas de los arroyos afluentes, La Choza, la Horqueta, Durazno (Rigacci *et al.*, 2013), los que se encuentran en una zona agrícola ganadera. Por lo tanto, si bien sería esperable que estos arroyos recibieran plaguicidas por efecto de escorrentía, de estar presentes, disminuirían notablemente su concentración en agua en la represa y a la salida de la misma, por efecto de dilución y distribución en columna de agua y sedimento. Plaguicidas, PCB, hidrocarburos alifáticos, etc, han sido ya encontrados debido a este tipo de efectos en diferentes cuerpos de agua de la región (Scarcia, 2014). En particular, para los arroyos que convergen en la formación de la represa y dan origen al río Reconquista, se han encontrado diversos de estos tipos de contaminantes (Rigacci, 2013), aunque como arriba se mencionó, la represa de alguna manera depura varios de estos, explicando así la poco probable cuantificación en nuestra zona de muestreo, debido al bajo flujo de agua que se genera en los reservorios, mejorando la calidad de sus aguas porque permite la sedimentación de materiales (Garnier *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2009). Además, se debe considerar que las descargas de plaguicidas a los cuerpos de agua son habitualmente

eventos puntuales, asociados a malas prácticas agrícolas durante la aplicación, cuyos efectos sobre la biota acuática dependen, además de su toxicidad inherente, de sus particularidades químicas que perfilan su interacción con el medio, tales como tiempos de vida media en agua, hidrólisis, fotólisis, adsorción a sedimentos, etc. En resumen, puesto que las tomas de las muestras de agua fueron hechos puntuales, la no detección de cantidades cuantificables de plaguicidas en las mismas no necesariamente indicaría ausencia de éstos en el sitio de muestro en niveles menores al límite de cuantificación de las técnicas y/o en un periodo distanciado temporalmente de la toma de la muestra.

Aunque el perfil físico-químico de las aguas y su bajo grado de polución pueden explicar la alta tasa de supervivencia de los peces expuestos a las aguas del RR que ya fue discutido en el Capítulo 4, como se describió en el presente capítulo, los peces expuestos sufrieron alteraciones de algunos biomarcadores metabólicos y bioquímicos. Se evidencia así, que la evaluación fisicoquímica de muestras complejas como sucede con aguas receptoras (en este caso del río Reconquista), resulta insuficiente para su adecuada caracterización ecotoxicológica.

En suma, para la evaluación ecotoxicológica de cuerpos de agua continentales, los muestreos puntuales son insuficientes y es por ello que se requieren programas de monitoreo prolongado. El monitoreo de sistemas acuáticos que reciben descargas complejas de contaminantes requiere una información más integrada que considere múltiples enfoques, teniendo en cuenta, además de la influencia de otros factores como las temporadas de lluvia y las variaciones de la temperatura a lo largo del año, ya que pueden influir sobre la calidad del agua y sus aspectos fisicoquímicos llevando a una mala interpretación acerca de los efectos toxicológicos (Brooks *et al.*, 2006). A ello se debe agregar la natural variabilidad a lo largo del año de determinados parámetros biológicos, usados como biomarcadores, que depende tanto de la especie de ensayo, como de su estado de salud general y etapa del ciclo de vida entre otros aspectos.

Muchos estudios han sido realizados en este río para determinar la calidad de sus aguas desde un enfoque fisicoquímico y biológico mediante la realización de bioensayos de

exposición aguda o crónica sobre diferentes organismos como algas, anfibios, peces, anfípodos e inclusive en perifiton bajo condiciones controladas de laboratorio o en ensayos a campo (de la Torre *et al.*, 1997; 2007; Ferrari *et al.*, 2005; Vilches, 2012; Ossana *et al.*, 2013; Giusto *et al.*, 2014). Scarcia (2014) utilizó la cuenca superior del Río Reconquista como sitio de referencia en ensayos *in situ* con *Cyprinus carpio* y diferentes teleosteos nativos (frecuentadores de fondo) para evaluar el impacto de la contaminación de otros sectores del cauce. Nuestros resultados por exposición a 12 días bajo condiciones controladas de laboratorio pusieron de manifiesto que determinados biomarcadores ecofisiológicos de efecto temprano medidos en nuestra especie modelo, sufren, respecto a sus controles, alteraciones cuantificables. Esto podría indicar, que la cuenca alta del río Reconquista puede ser sitio de referencia respecto a sitios de la cuenca media o baja del río, pero de por si no podría ser establecido como sitio control.

Dentro de los parámetros biométricos medidos en este estudio (Figura 7.1), tanto el FC como el IHS mostraron valores en el rango esperable para controles (ver Capítulo 5). Respecto al FC, Ossana *et al.* (2016) realizó ensayos de exposición corta de 4 días, reportando resultados similares para la misma especie y medio de exposición. Estos resultados podrían hacernos suponer una baja carga de contaminantes en las muestras de todos los ensayos con agua del río y/o por otro lado una rápida metabolización de los contaminantes. Otros autores, en ensayos *in situ* y en laboratorio utilizando la misma especie obtenida del río Reconquista (de la Torre *et al.*, 2007) en ensayos de 30 días de duración, no encontraron diferencias entre controles y expuestos ni para FC ni para IHS. Sin embargo, es oportuno tener en consideración que el rango de valores reportados para ambos parámetros es superior a los nuestros y similares a los reportados para ejemplares del río Suquía, Córdoba (Hued *et al.*, 2010, 2013; Zambrano *et al.*, 2018). En este sentido debe considerarse que los animales utilizados por nosotros, criados en cautiverio y condiciones estables de laboratorio, típicamente muestran valores de FC e IHS menores a los registrados en ejemplares silvestres.

El índice IGS (Figura 7.2) como consecuencia de las mayores masas ováricas fue considerablemente mayor en las hembras del grupo RR respecto a su control en el ensayo

de invierno, ambos (peso de ovario e IGS) estuvieron por encima de los valores esperables para controles (Capítulo 5) incluso en invierno. Este resultado podría interpretarse inicialmente como un efecto sobre el ciclo reproductivo, sin embargo, para asumir un efecto de aceleración de la etapa de gestación y/o desarrollo ovárico, o incluso un efecto hipertrófico sobre las gónadas, se requiere un análisis histológico, aún no realizado. No puede descartarse la influencia de desorganizador endócrinos. Este diverso grupo de compuestos incluye entre otros, plaguicidas, detergentes, químicos de origen industrial, metales pesados y una amplia gama de fármacos. En este sentido, numerosos estudios han mostrado que las descargas residuales de aguas provenientes de las plantas de tratamientos pueden contener compuestos estrogénicos en concentraciones suficientes que afecten el desarrollo normal de las gónadas y sus características sexuales (Doyle & Lim, 2002; Jobling & Tyler, 2003). Un estudio realizado sobre machos de *C. decemmaculatus* recolectados por cuatro zonas diferentes del río Suquia, utilizando órganos copuladores como biomarcador de contaminación ambiental, demostró que el desarrollo del gonopodio se vio afectado por efectos de la exposición al medio de procedencia debido a las mezclas de contaminantes que presentaba (Zambrano *et al.*, 2018).

Generalmente, una situación de estrés induce cambios compensatorios en el metabolismo energético de los organismos. Debido a que la carga energética de los animales es utilizada para el crecimiento, reproducción y metabolismo estándar, el incremento en el costo energético del metabolismo puede llevar a estrés tóxico y a una reducción de las reservas energéticas (Giusto, 2014). Así, los *endpoints* de balance energético utilizados en este estudio y el comportamiento alimentario pueden verse influenciados por factores externos (por ejemplo, la estación, la hora del día, las condiciones ambientales) y factores internos (por ejemplo, desequilibrios hormonales y trastornos neurológicos, sensoriales y digestivos) (Hoskins & Volkoff, 2012). En condiciones naturales, es difícil discriminar cuál de estos factores es el principal responsable de un resultado particular. Sin embargo, el hecho de que nuestros experimentos se realizaron con el mismo *stock* criado en laboratorio nos permite concluir

que las diferencias encontradas entre los grupos RR y MHW se debieron al efecto del agua del río. De hecho, en comparación con controles, los peces expuestos a RR respecto al MHW mostraron una asimilación que si bien fue significativamente menor (Figura 7.3) con excepción del ensayo de invierno, se encontró aún en el rango esperable para controles (Capítulo 4). Estos resultados indican una reducción en la energía disponible para mantenimiento y el crecimiento en los animales expuestos a RR. Merece destacarse que, a diferencia de lo que ocurre con los peces expuestos a Cd (Capítulo 6), que también manifiestan una importante reducción de la A (Figura 6.3), en los expuestos a RR la reducción no se debe mayoritariamente a una disminución en la I sino principalmente a una mayor H, superior al rango de valores esperado en controles (Capítulo 4). Dado que la asimilación depende de la ingesta del alimento, se ha observado que en ensayos con *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a formulados agroquímicos (Glifosato y Clorpirifós), la tasa de ingesta entre controles y expuestos no variaba, aunque respecto a este trabajo el método para el cálculo de la ingesta fue diferente (Bonifacio, 2017). Por lo tanto, el aporte energético podría estar viéndose constante mientras que la excreción y TME aumentarían el gasto, afectando el balance energético neto que se reflejaría en los SFG.

Los procesos fisiológicos en teleósteos responden a factores ambientales como las corrientes de agua, la disponibilidad del alimento, la temperatura, el oxígeno disuelto o sus combinaciones (Kieffer *et al.*, 1998), por lo que se puede inferir que al ser constantes las variables mencionadas, las diferencias respecto a controles de los distintos parámetros metabólicos podrían adjudicarse al medio de exposición. Respecto a los parámetros metabólicos medidos a tiempo final de exposición (Figura 7.4), los animales expuestos a RR mostraron disminución de la TME, que con excepción del ensayo de verano es significativa respecto a los controles paralelos, y que se encuentran en el límite inferior del rango esperable para controles en los ensayos de primavera, verano y otoño. Por su parte, la EEO también se vio disminuida en los animales del grupo RR (significativamente solo para el ensayo de otoño) con un comportamiento de incremento en función de la estación climática (de primavera a invierno) en la que se realizó el ensayo, observada tanto en

controles como en los animales expuestos a Cd. Los valores de EEO en el grupo RR estuvieron comprendidos en el rango esperable para controles, su disminución podría indicar que la función en el epitelio branquial ha sido alterada por la exposición al agua del río. Así, Ossana *et al* (2019) demostraron que luego de una exposición corta a agua de la represa Roggero, las branquias de adultos de *C. decemmaculatus*, en comparación con sus controles, muestran uniones intercelulares más lábiles, un mayor número de células de cloruro y células mucosas, y la presencia de aneurismas en los vasos de las laminillas secundarias. Por otra parte, con respecto a la fisiología respiratoria de los peces, los cambios en el tejido branquial se caracterizan por una mayor distancia de difusión para el oxígeno (agua-sangre) y una superficie respiratoria más pequeña, lo que puede conducir a una hipoxia funcional (Richardset *al.*, 2009; da Cruzet *al.*, 2015), así como también una mayor distancia de difusión podría evitar el posible ingreso de tóxicos por vía sanguínea. Nuestros resultados parecen concordar con estos efectos. La diferencia encontrada en la TME de los grupos RR en el ensayo de invierno, al igual que la EEO, en el ensayo de otoño, pueden deberse al efecto del agua del río de esos bioensayos, por sobre la captación de oxígeno aumentada y mayor eficiencia de extracción de este. Por otra parte, las branquias de los peces son un órgano blanco importante para los metales presentes en el medio, representando la mayor ruta de ingreso de estos (Tao *et al.*, 2006). Considerando la presencia de diferentes metales en las muestras ambientales, con concentraciones incluso que superan los límites permitidos (el cobre durante la primavera fue hallado en una proporción de 50 veces más según los límites permitidos para la protección de la biota acuática), los peces podrían regular la tasa metabólica como una manera de adaptarse al medio (De Boeck *et al.* 2006). Por otro lado, la excreción de amonio (E) y el cociente de amonio (CA), acompañaron los comportamientos observados, encontrándose un aumento de ambos parámetros en los grupos expuestos al agua del río. Los valores de E y CA, elevados considerablemente por encima del rango esperable para controles (Capítulo 5), registrados en los ensayos de primavera y verano podrían indicar una considerable cantidad de proteínas catabolizadas, lo que sugiere que estos animales tendrían alguna deficiencia energética. Viendo estos resultados y considerando que el FC no se vio

afectado, el aumento del catabolismo de proteínas posiblemente se destine a ajustar la homeóstasis adaptativa a las condiciones externas.

El comportamiento del SFG como índice fisiológico que integra las diferentes variables del balance energético da cuenta de la energía disponible para el crecimiento (Scarlett *et al.*, 2015). En nuestro estudio, observamos valores menores en los grupos RR respecto a los controles paralelos, en los ensayos de primavera, verano e invierno, significativo solo en primavera, pero por debajo del rango esperable para controles tanto en el ensayo de primavera como de verano (Capítulo 5). Esta respuesta podría deberse a una reducción del aporte de energía a partir de la baja asimilación, a un metabolismo aeróbico disminuido, manifestado por la menor TME observada y el aumento del catabolismo proteico. Esta es la primera vez que se utiliza este el SFG como biomarcador para evaluar la calidad de aguas receptoras. El mismo fue utilizado como biomarcador de efecto por exposición a Cden juveniles de *Cyprinus* y juveniles de *Ctenopharyngodon idella* (Ferrari *et al.* 2011, Espina *et al.*, 2000).

El análisis de los biomarcadores bioquímicos (Figura 7.5), indicó para los grupos RR y respecto a controles, un aumento de la actividad de AChE cerebral en los bioensayos de primavera y otoño y un importante descenso durante el verano. Por otro lado, en el hígado, la actividad de CAT se vio aumentada para los ensayos de otoño e invierno, así como la actividad de GST durante los ensayos de primavera e invierno y un importante descenso en el ensayo de otoño. El contenido de GSH hepático fue mayor en los grupos RR, pero solo significativamente en el ensayo de invierno, por su parte, se vio incrementado únicamente durante el bioensayo de invierno. Con excepción de la CAT, los demás biomarcadores presentaron un comportamiento estacional en condiciones de control (Capítulo 5) que debe considerarse al realizar contrastes. Así, en relación con la inhibición de la AChE en el grupo RR del ensayo de verano, cuando los controles muestran picos de actividad, adquiere una significación mayor, puesto que presumiblemente, el agua del río estaría afectando el normal comportamiento circanual de la enzima.

Utilizada ampliamente en ensayos toxicológicos (Bradbury *et al.*, 2008), el estudio de la actividad de AChE es útil para evaluar el funcionamiento nervioso a nivel colinérgico de los organismos. La acción de este neurotransmisor es fundamental para los comportamientos que requieren la búsqueda de comida, la evasión de predadores y variados procesos fisiológicos (Moreira y Guilhermino, 2005; Moraes *et al.*, 2007). La activación de la AChE como en el caso de los bioensayos de primavera y otoño, o la inhibición como ocurrió durante el verano, podría influir durante la neurotransmisión para la realización de las funciones anteriormente nombradas. Varios son los compuestos que pueden estar presentes en las aguas con acción neurotóxica, entre otros, los metales pesados, pero también las diferentes condiciones ambientales puedan ser responsables de la respuesta de la enzima (Jebali *et al.*, 2006; Salbego *et al.*, 2010; Ossana, 2011; Richetti *et al.*, 2011). Así, la inhibición de la AChE en el ensayo de verano, podría deberse a la acción de otros compuestos como hidrocarburos, alquil-fenoles u otros plaguicidas no investigados (Moraes *et al.*, 2007; Ossana, 2011). de la Torre *et al.* (2005), utilizando ejemplares de *C. decemmaculatus* provenientes de la parte alta y media del río Reconquista, obtuvo valores similares y significativamente bajos de la actividad de esta enzima medida en el cerebro respecto al sitio de referencia medido en río. Otros estudios de AChE sobre la misma especie, han reportado la inhibición de la actividad de esta enzima luego de exposiciones a contaminación ambiental con metales pesados y herbicidas (de la Torre *et al.*, 2007; Menéndez-Helman *et al.*, 2012; Bonifacio, 2017), dejando sentado que para *C. decemmaculatus*, esta enzima es sensible para utilizarse como biomarcador en ensayos ecotoxicológicos.

El contenido de GSH hepático es indicador de procesos de biotransformación de tóxicos. Si bien todos los grupos RR mostraron un aumento de GSH, solo fue significativo durante el bioensayo de invierno. Ossana *et al.* (2013) obtuvieron también aumentos significativos del contenido de GSH medido en hígado de ejemplares de *Lithobates catesbeianus* expuestos a muestras ambientales del río reconquista en ensayos a 6 días. Ossana *et al.* (2016, 2019) expusieron adultos de *C. decemmaculatus* a agua de la represa Roggero en primavera y otoño en ensayos de cuatro días de extensión en los que, a diferencia de lo

realizado en este estudio las determinaciones de los biomarcadores de estrés oxidativo se realizaron sobre la parte media del cuerpo (incluyendo además del hígado a las restantes viseras. En esas condiciones la actividad de GSH fue menor que sus controles. La discrepancia en los resultados, además de la metodología ya mencionada, es probablemente atribuible al menos tiempo de exposición. GSH es además cofactor de varios enzimas como la GST, encontrándose principalmente en el hígado y ha sido informada como primera barrera de defensa contra la hepatotoxicidad frente al Cd (Rani *et al.*, 2014).

La CAT y la GST son biomarcadores indicadores de la actividad antioxidante celular. Diferentes trabajos muestran el comportamiento irregular de la actividad de GST, al igual que lo que se observó para GSH: en particular para adultos de *C. decemmaculatus*, Ossana *et al.* (2016; 2019) registran inhibición en primavera y no efecto en otoño para GST y no efecto en primavera e inhibición en otoño para CAT. Bonifacio *et al.* (2016) demostró que para *C. decemmaculatus* sujeto a ensayos de largo término a Clorfox®, Round up Max® y sus mezclas, la actividad de CAT es variable, asumiendo la posibilidad de diferentes comportamientos en el hígado para esta enzima. Como se dijo en el capítulo anterior y en particular para los biomarcadores de estrés oxidativo, no existe una regla general de comportamiento en función de la composición del medio de exposición, o dicho de otro modo, especificidad de respuesta; el sistema redox es activado por metales como el Hierro, el Cobre y el Cromo, mientras que es inactivado por metales como el Plomo, el Cadmio, el Mercurio y otros depletores de antioxidantes celulares, particularmente de aquellas enzimas que contienen un grupo tiol (-SH). (Hermes-Lima, 2004) y es sensible a una variedad de efectos estresores ambientales.

Dado que las especies reactivas de oxígeno pueden resultar de la exposición acontaminantes, pero también pueden producirse durante la respiración aeróbica, la actividad metabólica elevada puede dar lugar a elevados niveles de EROS (Arun & Subramanian, 1998; Hoguet & Key, 2008). También se puede asumir que la respuesta antioxidante ante el estrés, como se desprende del trabajo de Viarengo *et al.* (1998), es probablemente dependiente de varios componentes: la defensa antioxidante constitutiva,

al igual que el estado fisiológico de los individuos o el aporte nutricional de antioxidantes autóctonos. En consecuencia, la evaluación de ecotoxicidad mediante indicadores de estrés oxidativo por sí solo puede resultar de interpretación confusa, por lo que el uso simultáneo de varios marcadores biológicos es importante para minimizar posibles interpretaciones erróneas, sobre todo en los casos de situaciones complejas de contaminación (Linde-Arias *et al.*, 2008).

Como se puede observar, los biomarcadores del estrés oxidativo muestran importante variabilidad en las respuestas tanto en función de la estacionalidad, como del tiempo de exposición. Por otra parte, la respuesta del órgano blanco además de la compleja composición de las mezclas de contaminantes presentes en cada muestra, puede ser afectada por numerosos factores independientes de estos biomarcadores, como los genéticos, la condición de salud y estado nutricional, edad y sexo, entre muchos otros, los cuales pueden estar actuando de manera sinérgica o antagónica. Por otra parte, los estresores ambientales, al ser de variada naturaleza y diferentes orígenes, inducen estrés oxidativo produciendo diferentes respuestas en cada órgano, dependiendo de la magnitud del estímulo y llegando a ser respuestas adaptativas (como la modulación de mecanismos de biotransformación, la inducción de sistemas antioxidantes) o involucrar la activación de vías de transducción de señales que llevan a la muerte celular (Ossana, 2011). Los estudios con mezclas complejas de diferentes contaminantes, como es el caso de aguas receptoras, pueden interactuar entre sí haciendo más complejo su estudio, agregando incertidumbre a la interpretación de las respuestas.

6 CONCLUSIONES

A continuación, se escriben las principales conclusiones obtenidas para resultados de la exposición por 12 días de adultos de *C. decemmaculatus*, a aguas receptoras obtenidas de las nacientes del río Reconquista, bajo las condiciones experimentales.

-Las muestras de agua del río reconquista pudieron ser caracterizadas como prístinos y de polución leve, según los índices, respectivamente. Valores ICAB: 8.8 - 8.6, ICAP: 8.2 - 6.3.

-Si bien existe una importante variabilidad individual para los distintos biomarcadores utilizados, en general estos resultaron ser sensibles a la exposición al agua del río Reconquista. Se demuestra que la misma tiene un deterioro de su calidad con efecto sobre los peces, que es factible de ser demostrado en laboratorio mediante un bioensayo protocolizado para la evaluación de efectos tempranos con adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* como organismo prueba.

-Los biomarcadores biométricos no fueron sensibles al efecto de la exposición. Sin embargo, la respuesta del IGS en uno de los ensayos abre como perspectiva la posibilidad de indagar sobre los posibles efectos en la reproducción mediante el uso de otros parámetros biológicos no incluidos en este estudio, como el seguimiento del ciclo gonadal.

-La menor asimilación, TME y EEO, así como incremento del catabolismo de las proteínas demuestran que los animales expuestos al agua del río se encuentran bajo una situación de estrés que altera el balance energético. La integración de estos parámetros en el índice de balance energético, SFG, que manifiesta menores valores en los grupos expuestos al agua del río y en particular en el ensayo de primavera, demuestra que los animales tienen menos energía disponible para su crecimiento, una capacidad homeostática disminuida y, en consecuencia, es esperable que sean más vulnerables a situaciones estresantes de distinta índole. En particular, los parámetros obtenidos acerca del metabolismo energético en *C. decemmaculatus*, son los primeros realizados con la especie expuesta a muestras ambientales.

-Entre los biomarcadores bioquímicos, la actividad específica de la AChE cerebral por un lado se diferenció de controles y por otro, manifiesta una disrupción del ciclo circanual descrito para la especie, con valores de actividad muy por debajo del rango esperable para la especie en el ensayo de verano según los resultados obtenidos para su línea de

base, en donde son esperables los picos de mayor actividad de esta enzima. Entre los biomarcadores de estrés oxidativo en hígado, la actividad de la CAT y GSH se estimuló en los grupos expuestos a RR en tanto que la GST manifestó un comportamiento de estimulación menos evidente. Los resultados obtenidos en este estudio y en comparación con los recabados en la bibliografía tanto para la misma especie como para otros teleósteos e incluso especies filogenéticamente muy distantes, hacen concluir que, utilizados de forma unitaria, estos parámetros de estrés oxidativo no resultan biomarcadores de efecto temprano confiables, siendo recomendable su análisis de forma integrada con otros biomarcadores.

CAPÍTULO 8

Integración de biomarcadores mediante la aplicación de índices de estado de salud del animal o *fitness*: aplicación de IBR y el SFG.

1 INTRODUCCIÓN

El estudio del impacto de la degradación ambiental sobre la biota acuática ha sido históricamente abordado desde un enfoque univariado, mediante la determinación de uno o varios *endpoints* de diferente índole, y complementado con los resultados obtenidos de los análisis físicoquímicos de las muestras ambientales. En estos últimos años distintos estudios resaltan la importancia de utilizar biomarcadores a diferentes niveles de respuesta biológica, seleccionados a partir de su sensibilidad y capacidad de respuesta, para ser incorporados dentro de un índice que otorgue una respuesta integral del *fitness* y estado de salud de aquellos organismos que se encuentran expuestos a diferentes mezclas de xenobióticos (Lu, 2013; Delfino Vieira, 2014; Hook, 2014; Scarcia, 2014; Valerio García, 2017).

La elaboración de estos índices pretende dar un enfoque integrado del efecto del medio sobre los individuos, y una evaluación más realista de las respuestas desencadenadas en situaciones de estrés por contaminación. Además, *a priori*, su uso puede ser implementado no solamente en bioensayos de laboratorio y de campo sino también y a futuro, para evaluar las respuestas biológicas de integrantes representativos de la biota, en el marco de programas de monitoreo ambiental de cuerpos de agua contaminados. Idealmente los índices deben ser capaces de resumir en un valor el estado de deterioro de salud de los organismos, como resultado de la exposición a una mezcla compleja de

estresores y sus interacciones por un lado y de la particular situación fisiológica o capacidad de respuesta homeostática, por otro.

Se debe considerar, además, que los *endpoint*/biomarcadores que integran la ecuación de los índices suelen presentar variabilidad intra-específica que suele provocar una difícil y confusa interpretación de los resultados. A la variabilidad individual se deben sumar los procesos homeostáticos adaptativos y la condición de vida de los ejemplares utilizados para la evaluación. La utilización de índices, minimiza esas diferencias entre las respuestas, globalizando un resultado integral que incluye varios biomarcadores de manera conjunta.

En este capítulo, pretenderemos evaluar la respuesta integrada de *Cnesterodon decemmaculatus* mediante dos índices de biomarcadores de diferente categoría (Metabólico y bioquímico) en condiciones de exposición controlada al medio control MHW, aguas receptoras del río Reconquista (RR) y al tóxico de referencia, Cd, por un período de 12 días.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO

La hipótesis puesta a prueba es: que, bajo las condiciones de ensayo protocolizado de evaluación de efecto temprano, en adultos de *C. decemmaculatus*, los índices de respuesta de biomarcadores (IBR) y *Scope For Growth* (SFG) o campo de crecimiento, resultan herramientas adecuadas para evaluar el deterioro de salud de los animales.

El objetivo es integrar las respuestas metabólicas y bioquímicas a partir de la información recopilada de los parámetros estudiados en los capítulos anteriores con el fin de evaluar la utilidad del IBR y SFG como índices de estado de salud de la especie en condiciones experimentales.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Índices de *fitness* o estado de salud del animal:

-Scope For Growth (SFG) o campo de crecimiento. El mismo se calculó a partir de los valores de asimilación del alimento (-A) tasa metabólica específica -TME y excreción de amonio -E como ya fuera detallada en el Capítulo 5

Los resultados de este índice ya fueron descriptos en los capítulos anteriores para todos los grupos experimentales (control negativo -MHW, grupos expuestos al tóxico de referencia, Cd y grupos expuestos a muestras ambientales provenientes del río Reconquista -RR) pertenecientes a los cuatro bioensayos. En este capítulo el análisis se centra en la comparación de efectos entre los tres grupos y entre ensayos para cada tratamiento.

Cada grupo de datos de SFG de cada uno de los ensayos fue analizado para confirmar los supuestos de ANOVA. Para el análisis de normalidad se utilizó el test de Shapiro Wilks modificado y el test de Levene para homocedasticidad. Puesto que varios de los grupos de datos no cumplieron con alguno de los supuestos, se aplicó análisis no paramétrico de Kruskal Wallis seguido de comparaciones de a pares. Se utilizó el programa estadístico INFOSTAT versión 2018e (Di Rienzo *et al.*, 2014).

-Índice de respuesta de biomarcadores (IBR): para la elaboración del mismo se utilizaron los siguientes parámetros bioquímicos: actividad de acetilcolinesterasa -AChE cerebral, actividad de catalasa -CAT, glutatión-S-transferasa -GST, contenido de glutatión reducido -GSH de hígado y el contenido de proteínas de cerebro e hígado- Pc, Ph. El IBR, por sus siglas en inglés (*Integrated Biomarker Response*) es un índice cualitativo general de estrés (Beliaeff & Burgeot, 2002) y fue elaborado para comparar e integrar las respuestas obtenidas de los biomarcadores seleccionados, en los cuatro ensayos y para cada uno de los tratamientos. Los valores grandes de IBR son directamente proporcionales con niveles elevados de estrés en el ambiente. Este índice fue calculado con un programa

desarrollado por el centro CITEDIC de la Universidad Nacional de Luján, Argentina. Este programa, genera todas las posibles permutaciones de las variables utilizadas para el cálculo del IBR y construye un gráfico de estrella cuya área representa el valor final del índice (CITEDIC, 2017)

En principio, los datos fueron estandarizados para las comparaciones visuales directas de las respuestas. Los datos estandarizados (Y) se calcularon de la siguiente manera:

$$Y=(X-m) /S$$

donde: X= valor de la respuesta correspondiente a cada biomarcador,

m= media general de cada parámetro biomarcador,

S= desvío estándar de cada parámetro biomarcador.

A partir de los datos estandarizados se obtuvo el valor mínimo para cada biomarcador (Y).

Por último, el score (S) se calculó como:

$$S=Y + |min|,$$

donde $S \geq 0$ Y $|min|$ es el valor absoluto.

Para visualizar los resultados se realizaron gráficos de estrella (*start plots*), mediante Excel (Microsoft Office): cada uno de los parámetros estandarizados fue representado gráficamente como un vector en el gráfico de estrella.

Cuando S_i y S_{i+1} representan los *scores* de los biomarcadores consecutivos, el IBR fue definido por el área encerrada dentro del polígono formado por la unión de todos los vectores. Al mismo tiempo, el valor del IBR total se estimó mediante el procedimiento propuesto por Beliaeff & Burgeot (2002) con modificaciones (Devin & Burgeot, 2012):

$$IBR = [(S_i * S_{i+1}) /2 + (S_{i+1} * S_{i+2}) /2 + (S_{i+2} * S_{i+3}) /2 + (S_{i+3} * S_i) /2]$$

4 RESULTADOS

4.1 Scope for Growth (SFG)

Los valores de SFG para todos los tratamientos y ensayos aquí utilizados han sido extractados de los capítulos 5, 6 y 7 de la sección 2 de resultados. Los mismos se muestran en la Tabla (8.1). A fin de visualizar el grado de variación entre tratamientos respecto al control, se incluyó una columna indicando el % de variación de tratados respecto a MHW. En la misma se destacan las diferencias significativas entre los tratamientos intra-ensayo (ver anexo).

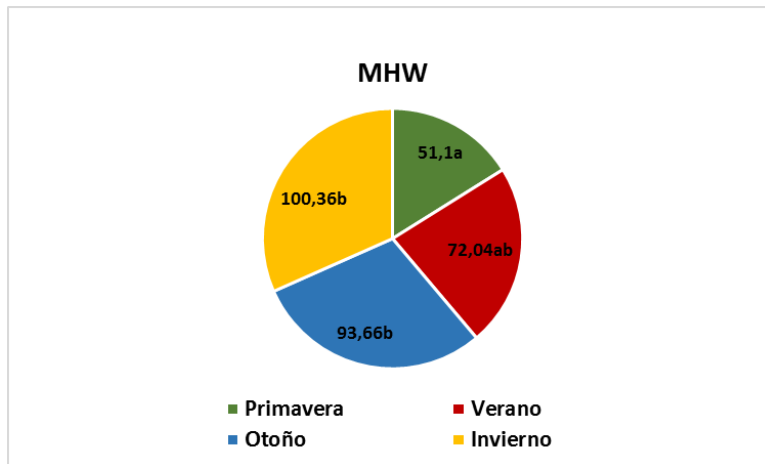
Tabla 8.1: Valores de SFG (J/g Ph/día) obtenidos luego de 12 días de exposición a MHW, Cd o RR en *C. decemmaculatus* para las cuatro estaciones ensayadas. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada ensayo ($P < 0.05$). Entre paréntesis, el n de cada tratamiento. Datos expresados como media \pm D.E. En la última columna se muestra el porcentaje de cambio relativo del grupo Cd y RR respecto al grupo control tomado como 100%.

Ensayo	Tratamiento	Media	D.E.	% variación
primavera	MHW (8)	51.1 ^a	17.86	100
	Cd (7)	-18,74 ^b	62.61	-63,3
	RR (7)	14 ^b	29.04	27,4
verano	MHW (4)	72.04 ^a	36.2	100
	Cd (4)	-29,57 ^b	49.87	-26
	RR (4)	16.85 ^{ab}	33.85	23,4
otoño	MHW (7)	93.66 ^a	26.49	100
	Cd (6)	-301,48 ^b	194.74	-321,9
	RR (6)	129.51 ^a	23.8	138,3
invierno	MHW (6)	100.36 ^a	27.84	100
	Cd (4)	-78,21 ^b	84.57	-77,9
	RR (5)	68.94 ^{ab}	31.95	68,7

Se puede observar que todos los grupos Cd de los cuatro bioensayos, mostraron valores significativamente menores, y negativos, respecto a los grupos control paralelo en MHW durante cada experimento. En cuanto a la comparación con los grupos RR, si bien sigue teniendo valores sumamente menores, no logra diferenciarse de estos (con excepción del

ensayo de otoño donde la diferencia es significativa). Respecto los grupos expuestos a las muestras ambientales RR en comparación con sus controles paralelos en MHW, si bien siempre tienen valores menores de SFG solo se diferencian significativamente en el ensayo de primavera.

La variabilidad inter-ensayo se grafica en la Figura 8.1, Los resultados estadísticos se encuentran en el Anexo. En MHW los SFGs son significativamente mayores en los ensayos de otoño e invierno y, de acuerdo al análisis de rangos, se establece el siguiente orden de decremento: primavera<verano<otoño< invierno. Para el grupo expuesto a Cd, se aprecia una importante disminución del SFG en el ensayo de otoño, estableciéndose el siguiente orden de decremento: otoño<invierno<verano<primavera. Respecto al grupo RR se evidencian valores de SFG significativamente mayores en los ensayos de otoño e invierno respecto a verano y primavera, estableciéndose el siguiente orden de decremento: primavera< verano<invierno<otoño.



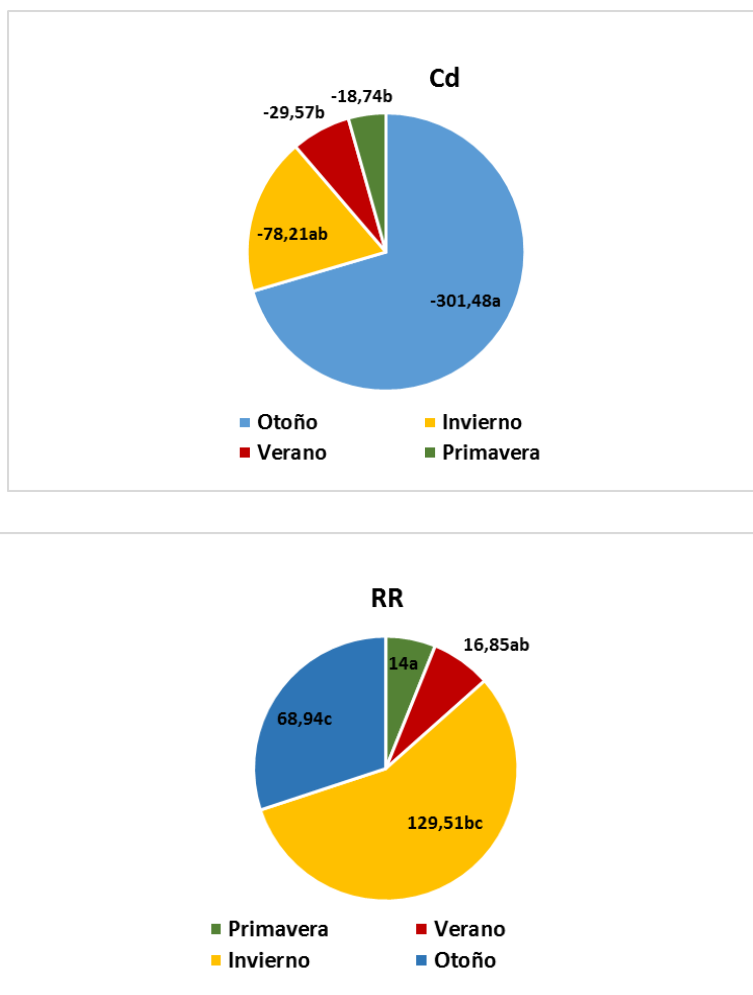
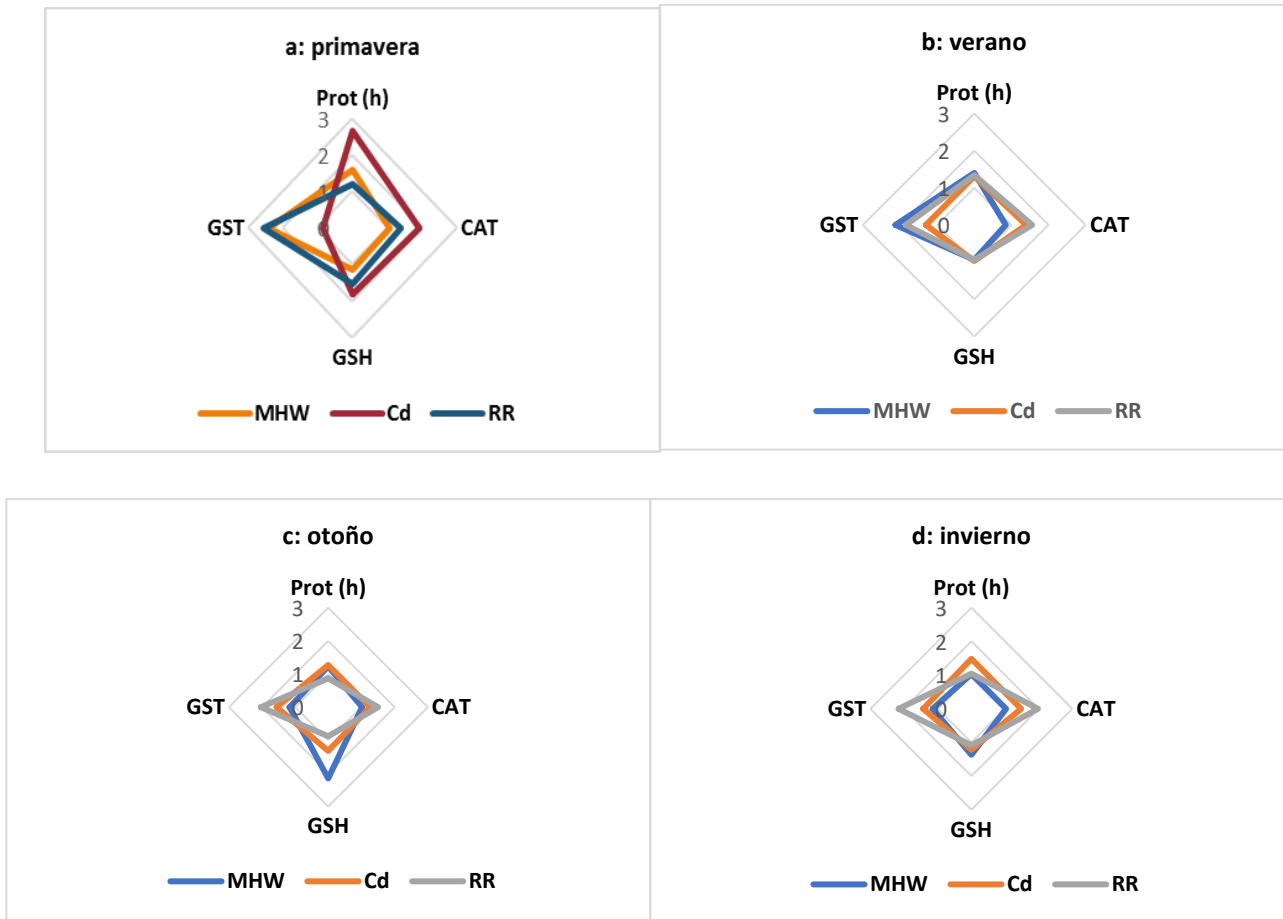


Figura 8.1: Variabilidad inter-ensayo del SFG calculado en *C.decemmaculatus* de cada tratamiento para cada estación, luego de 12 días de exposición a MHW, Cd o RR. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($P<0.05$).

4.2 Índice de respuesta de biomarcadores (IBR) utilizando biomarcadores bioquímicos.

A continuación (Figuras 8.2 y 8.3), se muestran los resultados en gráficos en estrella de los tres tratamientos (MHW, Cd y RR) para los diferentes ensayos. Cabe aclarar que el IBR se calculó para cada tratamiento y los cuatro ensayos utilizando los valores a tiempo final de exposición de la actividad específica de la enzima Catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST), glutatión reducido (GSH) en el hígado y contenido de proteínas en hígado (Prot h)

que se aprecian en el Gráfico 8.1 a-d. A fines comparativos la actividad específica de la acetilcolinesterasa cerebral (AChE) y el contenido de proteínas en cerebro (Pot c) fueron agregadas como variables para recalcular los IBRs para los tres ensayos que contaban con sus determinaciones: primavera, verano y otoño (Figuras 8.3 a-c).



Figuras 8.2 (a-d): índices de respuesta integrada de los biomarcadores (IBR) obtenidos en adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* 12 días de exposición a medio control (MHW), tóxico referente (Cd) y aguas receptoras del río Reconquista (RR). -Prot h: proteínas de hígado, -CAT: actividad de catalasa; -GSH: actividad de glutatión S-transferasa; GST: contenido de glutatión reducido.

En el ensayo de primavera (Figura 8.2 a), los valores del IBR fueron: 5.3 MHW; 6.3 Cd; 6.0 RR. Durante este ensayo, se puede ver que tanto para el grupo control MHW como para el RR, la GST mostró mayor variabilidad en sus respuestas, lo que incide en el área mayor

abarcada en esa zona del gráfico. La enzima GST, para el grupo RR, ya había diferido en su actividad respecto a lo observado para el grupo MHW (ver Capítulo 7), siendo correlativo con la mayor área en esa zona del gráfico, debido a la variabilidad de datos obtenidos para ese biomarcador. En tanto, el grupo Cd mostró mayor dispersión de datos, principalmente para prot h, CAT y GSH en segundo lugar, siendo su área total la mayor de los tres tratamientos. Esto es coherente con los demás resultados obtenidos en los grupos expuestos, en donde el estrés generado por el Cd repercute en toda la batería de biomarcadores utilizados. La integración de resultados en el IBR, condice con lo visto en los anteriores capítulos al analizar los biomarcadores bioquímicos individualmente, en donde las actividades enzimáticas y el contenido de glutatión fueron menores respecto a los controles en MHW.

Para el caso del ensayo de verano (Figura 8.2 b), los IBR fueron: 3.3 MHW, 4.1 Cd y 3.4 RR. En este caso, el grupo MHW, nuevamente el de menor área, y RR, muestran una mayor variabilidad para el caso de la GST, pero la mayor área fue obtenida por el grupo Cd, concordante con lo explicado para el caso de la primavera. Para el ensayo realizado en verano, ya se había comprobado (Capítulo 6) que los animales expuestos a Cd mostraban mayor actividad enzimática de CAT y contenido de GSH respecto al MHW, lo que hace suponer una mayor variabilidad en los datos que puede deducirse de la mayor área obtenida para este grupo. Además, para el mismo ensayo para el grupo RR no se habían encontrado valores de actividad enzimática diferentes de los controles MHW, por lo que las áreas obtenidas acá conciden con ello y son similares entre sí.

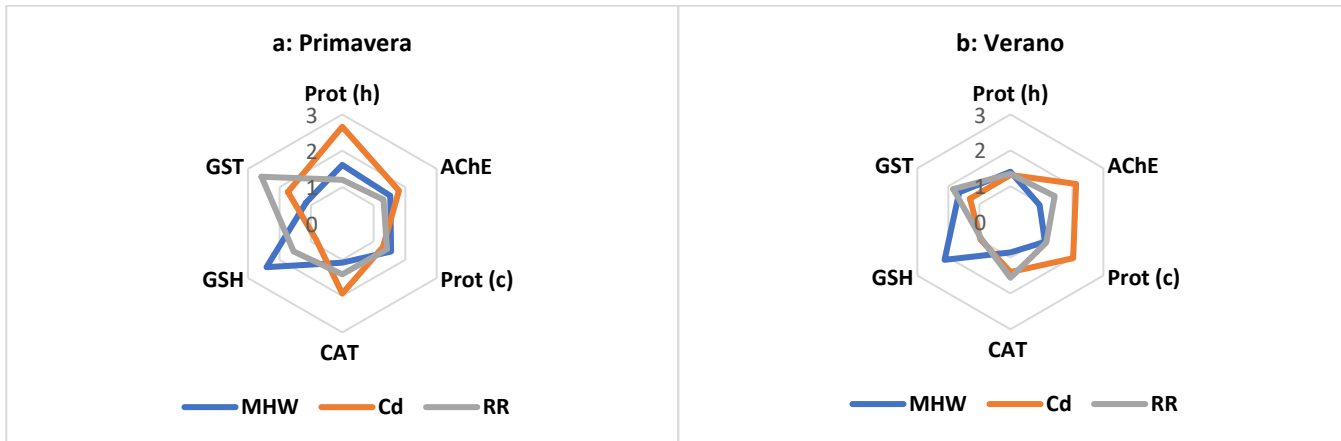
En el ensayo de otoño (Figura 8.2 c), los IBR fueron: 3.7 MHW; 3.8 Cd y 3.0 RR. En este caso, la mayor variabilidad de datos para el MHW se explica primordialmente por el contenido de GSH, mientras que para el RR fue la GST. En el caso del grupo Cd, nuevamente mostro una leve tendencia a aumentar su área respecto a los demás tratamientos. En el caso la actividad de CAT y GST del grupo Cd tuvieron un aumento respecto a los controles en MHW no significativo, así como el contenido de GSH fue significativamente menor para el grupo expuesto a Cd (ver Capítulo 6). Del mismo modo, para el grupo RR, se habían visto

diferencias para las actividades enzimáticas obtenidas de GST y CAT respecto al MHW (ver Capítulo 7).

Por último, para el ensayo de invierno (Figura 8.2 d), se obtuvieron los siguientes valores de IBR: 2.6 MHW; 3.9 Cd y 4.7 RR. En este caso fue el grupo RR el de mayor variabilidad de datos, siendo quienes más dispersión muestran los biomarcadores GST y CAT y resultando en la mayor área de los tres tratamientos. Este grupo ya había mostrado un aumento de las actividades enzimáticas de CAT, GST, así como del contenido de GSH respecto a los controles en MHW. El grupo Cd, por su parte, había mostrado un mayor aumento en sus actividades enzimáticas y contenido de GSH respecto a los grupos en MHW (ver capítulo 6).

En resumen, con la excepción del ensayo de otoño, donde el área obtenida para los grupos MHW fue algo mayor respecto a los grupos RR, el área obtenida para los grupos MHW fue la más pequeña respecto a los demás grupos RR y respecto a los grupos Cd, los cuales a su vez mostraron un área mayor en todos (excepto en invierno) respecto a MHW y RR.

En la Figura 8.3 a-c, se muestran los resultados de los IBR recalculados con la incorporación de las variables AChE y contenido de proteínas del cerebro, Prot c.



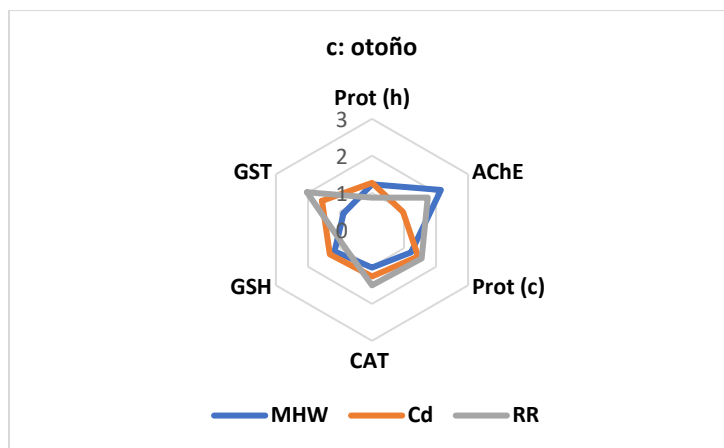


Figura 8.3 (a-c): índices de respuesta integrada de los biomarcadores utilizados (IBR) graficados como *Stars blots* o gráficos estrella, evaluados en *Cnesterodon decemmaculatus* 12 días de exposición bajo condiciones controladas de laboratorio. -Prot h: proteínas de hígado, -AChE: actividad de acetil-colin-esterasa; Prot c: proteínas de cerebro; -CAT: actividad de catalasa; -GSH: actividad de glutatión S-transferasa; GST: contenido de glutatión reducido.

Los valores de IBR obtenidos para el ensayo de primavera (Figura 8.3 a) fueron los siguientes: MHW 6.1; Cd 7.4 y RR 6.3. en el caso del MHW, la mayor variabilidad fue aportada por la GSH, GST en el caso del RR y prot h, AChE y CAT para el Cd, donde este último fue quien mayor área del gráfico abarcó, teniendo una mayor dispersión de datos en casi su totalidad. GST y AChE ya habían presentado un incremento en sus actividades en los grupos RR respecto al grupo control MHW (discutidos en el capítulo 7).

En el caso del ensayo de verano (8.2 b), los IBR fueron: 4.6 MHW; 5.9 Cd y 4.9 RR. GSH fue el de mayor dispersión para el grupo MHW, mientras que AChE, prot c y CAT fueron los biomarcadores que mayor dispersión se obtuvieron para el grupo Cd, y CAT y GST en el caso del grupo RR. La actividad de AChE tanto en el grupo Cd como en RR, habían mostrado anteriormente diferencias respecto al control MHW (ver capítulos Cd y RR), con un comportamiento estacional para esta época.

Por último, para el caso del otoño (Gráfico 8.2 c), los IBR fueron los siguientes: 4.1 MHW; 4.4 Cd y 5.2 RR. La AChE fue quien mostró una mayor variabilidad para el caso del tratamiento con MHW, GSH y prot h para el caso del Cd, y GST, CAT y prot c para el grupo

RR. En el ensayo de otoño, el grupo Cd y el grupo RR habían mostrado diferencias significativas en las actividades enzimáticas respecto al grupo control, con un aumento de la actividad de CAT y AChE e inhibición de GST para el caso del RR y un incremento de AChE y disminución del contenido de GSH para el grupo Cd (ver capítulos 6 y 7).

Nuevamente, como se puede observar, en todos los casos el grupo MHW fue el de mayor área obtenida, siendo menor la variabilidad obtenida para estos biomarcadores con este medio de exposición, mientras que el tratamiento con mayor área (mayor variabilidad) con la excepción del ensayo de otoño, fueron las de los grupos Cd.

5 DISCUSION

Distintos biomarcadores, a nivel individual, celular o subcelular, y la integración de estos en diferentes tipos de índices utilizados como *endpoints* en ensayos de exposición a diferentes contaminantes, son una herramienta importante para fines diagnósticos (Hook *et al.*, 2014; Amiard-Triquet & Berthet, 2015; Colin *et al.*, 2016). Particularmente los índices resultan de importancia como parámetro para el establecimiento de nivel de daño en programas de monitoreo. En este capítulo, se analizó la respuesta de algunos parámetros biomarcadores cuando los mismos son integrados en dos índices diferentes (bioquímico y metabólico) de manera de obtener un valor que minimice la variabilidad de respuesta de los animales expuestos a los diferentes medios ensayados.

Como consecuencia directa o indirecta de situaciones meramente biológicas o fisiológicas y la existencia de la inherente variabilidad individual, los procesos homeostáticos adaptativos en respuesta a la exposición a un tóxico o una mezcla de estos varían según las condiciones de vida de los animales expuestos. Para el contexto de un biomonitoreo, las respuestas individuales de los diferentes biomarcadores pueden mostrar un rango amplio de respuesta, muchas veces difícil de diferenciar del rango de respuesta obtenido

para los animales expuestos a medio control. Debe tenerse en consideración que los animales responden al estrés como un todo, por ello resulta útil evaluar su respuesta en igual sentido. Diferentes estudios durante estos últimos años, resaltan la importancia de utilizar biomarcadores a diferentes niveles de respuesta biológica, que provean un resultado integrado sobre la condición de los diferentes organismos que habitan los ambientes poluidos donde se encuentran las mezclas de contaminantes (Maggioni *et al.*, 2012). La combinación de múltiples biomarcadores en un único valor para una mejor interpretación de los resultados, ha sido considerada por varios autores (Vieira *et al.*, 2014, 2016, entre otros). Aunque el uso de índices integrados es más laborioso que los análisis convencionales univariados, estos proveen una mejor observación de las respuestas de los animales bajo condiciones de estrés (Valerio-García *et al.*, 2017).

En este estudio fueron utilizados diferentes tipos de biomarcadores de nivel bioquímico y metabólico para analizar las respuestas integradas de los peces expuestos a medio control (MHW), a una concentración sub-tóxica de Cd 0.5 mg/l y a muestras ambientales provenientes del río Reconquista, bajo condiciones experimentales protocolizadas. Los biomarcadores utilizados, fueron agrupados de acuerdo a su categoría para la construcción de dos índices diferentes: el índice de respuesta integral de biomarcadores (IBR) para aquellos parámetros bioquímicos, y el *Scope for Growth* (SFG). Los parámetros metabólicos, tales como tasa metabólica y excreción, así como el comportamiento alimentario de los animales, evaluado aquí mediante el cálculo de Asimilación, que se utilizan para el cálculo de SFG, pueden verse influenciados tanto por factores internos como externos (Hoskins & Volkoff, 2012). El SFG es una herramienta útil para el análisis integrado de respuestas que involucran el metabolismo energético e indica la energía disponible para el crecimiento y reproducción de los animales luego de los requerimientos energéticos necesarios para la respiración y excreción (Scarlet *et al.*, 2015). El mismo fue usado previamente como biomarcador de efecto por exposición a Cd en *Cyprinus carpio* (Ferrari *et al.*, 2011) y se carecía de información sobre el mismo para la especie modelo hasta ahora. Como ya se explicó en los capítulos 5, 6 y 7, el SFG mostró variabilidad de respuesta, con un comportamiento estacional marcado para la época fría (Capítulo 5), y

reflejó, el estrés sobre el metabolismo energético que genera la exposición en todos los bioensayos Cd, y en el ensayo de primavera para los animales expuestos a RR. Además, como se puede apreciar en la figura 8.1, el SFG refleja claramente escasa variabilidad inter-ensayo para cada grupo MHW (aproximadamente el mismo porcentaje de 25 % para cada bioensayo) en contraste con los grupos tratados.

Los resultados observados demuestran una importante depleción de la energía disponible para crecimiento en los animales expuestos a Cadmio en los cuatro ensayos. Ello permite posicionar al Cd como tóxico referente útil para evaluación de crecimiento, dentro del contexto experimental protocolizado. En relación al comportamiento del SFG en los grupos expuestos a RR, demuestra un efecto diferencial respecto a los controles en MHW en uno de los cuatro ensayos, indicando también un efecto de menor energía disponible para crecimiento del grupo expuesto. Por su parte en medio control y aún en condiciones experimentales controladas, el SFG muestra un comportamiento diferencial en función de la estacionalidad (ver Capítulo 5), que se repite en los grupos tratados. Considerando que el SFG es una ecuación de balance energético, los resultados obtenidos ponen en evidencia la situación de “base” para responder al estrés por polución, que indudablemente repercutirá sobre la variabilidad de otros biomarcadores medidos. Sin embargo, el SFG cuenta con la desventaja de no ser un índice aplicable a estudios de campo, ante la imposibilidad de determinar en esas circunstancias el parámetro asimilación. Inevitablemente, esta es una técnica que debe realizarse bajo condiciones controladas de alimentación, siendo este factor altamente improbable de calcular en experiencias *in situ*.

El IBR propuesto por los autores (Beliaeff & Burgeot, 2002; Devín & Burgeot 2012) como ya se dijo, resume las respuestas de los biomarcadores y simplifica su interpretación, siendo práctica para utilizarla en ensayos de este tipo, multiparamétricos y con la finalidad de establecer grado de deterioro del estado de salud de los organismos expuestos. El IBR puede construirse con diferentes variables, pudiendo usarse tanto en ensayos de laboratorio como de campo y en animales colectados en su medio. Este índice, de alguna manera resumen las diferentes situaciones de exposición, que pueden ser mucho más

complejas en ensayos de campo, incluyendo los efectos aditivos de diferentes contaminantes, factores abióticos, las diferentes respuestas fisiológicas intra-especie, etc (Scarcia, 2014). En esta tesis el IBR se construyó con variables bioquímicas no incluidas en los restantes índices (SFG, FC, IHS e IGS).

El IBR (Figuras 8.2 a-d y 8.3 a-c) permitió determinar un mayor impacto negativo en los animales expuestos a las muestras con Cd respecto a aquellos animales en medio control o expuestos al agua del río Reconquista. El área abarcada y la variabilidad obtenida en los IBR pertenecientes a los grupos Cd, pone en evidencia la mayor dispersión de respuestas obtenidas sobre cada ejemplar perteneciente a cada bioensayo por exposición al metal, demostrando el efecto negativo del medio sobre los organismos.

En la mayoría (5 de 7) de los IBR calculados, los correspondientes al grupo Cd fueron los mayores, indicando así un claro efecto negativo del Cd sobre la especie prueba. Estos resultados, sumados al importante descenso de SFG, posicionan a estos índices como herramientas útiles para evaluación de efecto con Cd como toxico referente. Vale la pena destacar que, tanto para Cd como para los otros tratamientos, los IBR reflejan de igual manera el efecto de la exposición, incluso utilizando el mínimo necesario (cuatro) de biomarcadores para el armado del índice (Figura 8.2). Los grupos MHW y RR mostraron resultados casi siempre similares entre sí (aunque la menor área, por ende, variabilidad de datos obtenidos para cada biomarcador, siempre fue para el MHW, con excepción del ensayo de invierno donde los grupos RR fueron superiores. Este tipo de índices, puede reflejar así, la incidencia de contaminación del medio durante las diferentes estaciones del año, independientemente de la variabilidad en el conjunto de biomarcadores que se desee utilizar para su cálculo. Los gráficos estrella permiten visualizar los efectos biológicos mediante la utilización de las respuestas obtenidas sobre los diferentes parámetros bioquímicos utilizados.

En general, para los animales control, la mayor contribución al área del IBR fue dada por la actividad de GST y el contenido de GSH (Figuras 8.2 a-d y 8.3 a-b), dado que estos biomarcadores son los que más dispersión presentan durante estas estaciones. Por otro

lado, en prácticamente todas las actividades enzimáticas, los grupos Cd (Figuras 8.2 a-d y 8.3 a-c) se vieron perjudicados, en los cuatro ensayos. Los grupos RR, por su parte, mostraron un comportamiento similar o levemente mayor al del MHW en cuanto a la contribución de la variabilidad obtenida sobre GST (Figuras 8.2 a-d; 8.3 b) y también sobre CAT (Figura 8.2 b-d; 8.3 b-c), principalmente. Nuevamente, la incorporación de dos biomarcadores, (Figuras 8.2 a-d) no modifica el resultado de IBR ya que los biomarcadores incorporados no influyeron en gran medida al resultado final del área obtenida de IBR para este tratamiento. Scarcia (2014) mediante la utilización de ejemplares de *C. carpio*, utilizando también diferentes enzimas, obtuvo resultados similares en sus respuestas de IBR, también resaltando la utilidad de este índice para este tipo de ensayos ecotoxicológicos. Las diferencias en las formas de los gráficos en forma de estrella obtenidos en el IBR, reflejan así diferentes patrones de contaminación para las distintas muestras ambientales y al Cd. Esta aproximación provee una simple y general descripción del estatus de salud de los organismos. Estos resultados son comparables con los índices IBR obtenidos por Oliveira *et al.* (2009), quien analizó el daño enzimático en branquias de *Liza aurata* expuestos a diferentes niveles de contaminación, y por los obtenidos también por Valerio-García *et al.* (2017) quien estudió el estrés oxidativo y daño metabólico en respuesta a nanopartículas de plata sobre ejemplares de la especie *C. parvalis*.

En resumen, en el IBR se evidenció un patrón e intensidad en la variabilidad de respuesta en los grupos expuestos al Cd, y también en aquellos expuestos a las muestras ambientales del río se vio una cierta incidencia, tanto con la incorporación o no de AChE y las proteínas de cerebro como variables, pudiendo entonces concluir que este índice es útil para ser complementado con otros estudios de monitoreo y ensayos toxicológicos. Comparando ambos índices utilizados en este trabajo, si bien el SFG denota un mejor efecto por la exposición a contaminantes, la desventaja que posee, respecto al parámetro de asimilación improbable de realizar en ensayos a campo cual lo torna más complicado en comparación a la determinación de parámetros bioquímicos, más rápidos y fáciles de medir y utilizar para luego formular el índice propuesto de IBR. Hay que considerar que las muestras ambientales utilizadas para cada bioensayo, tuvieron valores de parámetros

físico-químicos diferentes, así como la concentración y tipo de mezclas de metales cuantificadas, lo cual repercute de manera particular sobre los ejemplares expuestos. Esto podría explicar por un lado los diferentes valores obtenidos de SFG para los grupos expuestos al agua del río, sino además las diferencias entre las áreas obtenidas para los IBRs.

6 CONCLUSIONES

-El SFG resultó ser un índice integrador de diferentes parámetros del metabolismo energético, útil para evaluar el impacto que sufren los ejemplares de *C decemmaculatus* en condiciones experimentales de laboratorio expuestos tanto a Cd como a diferentes muestras ambientales provenientes del río Reconquista.

-El IBR aplicado para integrar variables bioquímicas utilizado en este trabajo, resulta ser un índice práctico que puede utilizarse para evaluar distinto tipo de parámetros. Si bien las actividades enzimáticas muestran una importante variabilidad individual, se puede observar la correlación siempre existente entre los valores obtenidos de IBR para cada tratamiento y el SFG en aquellos animales expuestos al Cd o con el agua del río.

Sección III

Discusión general y

Conclusiones

CAPÍTULO 9

Discusión general y conclusiones

Se resumen aquí, los principales puntos detalladamente discutidos en los capítulos precedentes (Sección II).

Discusión

En el contexto de monitoreo ambiental de cuerpos de agua dulce, la realización de bioensayos estandarizados es fundamental para la comparación entre diferentes ambientes y para un mismo ambiente en función del tiempo. Este tipo de ensayos ecotoxicológicos requiere una protocolización de la metodología, así como la elección de la especie prueba, el medio de ensayo, la elección de *endpoints* adecuados y del tóxico de referencia, entre otros. La especie a utilizar para bioensayos estandarizados requiere que esta se encuentre validada, por lo que se torna fundamental conocer su biología y su respuesta a tóxicos referentes bajo un diseño experimental normado. Entonces, esta tesis pretende aportar un diseño de bioensayos de efecto temprano con una especie nativa, con el objetivo de su aplicación en estudios de monitoreo. Es por ello que el uso y selección de biomarcadores sensibles, así como el organismo modelo, resultan cruciales para llevarlo a cabo.

Se han estudiado las respuestas de algunos parámetros biomarcadores morfométricos (o biométricos), fisiológicos (del metabolismo energético) y bioquímicos a situación de estrés experimental. Se utilizó el agua reconstituida moderadamente dura como control negativo, una concentración teórica de 0.5 Cd mg/l como control positivo o de referencia, y agua proveniente de la cabecera del río Reconquista, como modelo de aguas receptoras, en ensayos de exposición de 12 días de duración bajo condiciones controladas de laboratorio con adultos de *Cnesterodon decemmacultus* como especie prueba.

En la sección II, se describió y discutió el efecto de cada uno de los medios de exposición utilizados y las respuestas de los parámetros biomarcadores/ *endpoints* a la exposición sobre los organismos de ensayo. El control negativo, MHW, resultó ser un medio que, si bien ya se encuentra estandarizado para utilizarlo en experimentos con diferentes organismos, incluida nuestra especie modelo (IRAM, 2008; Peluso *et al.*, 2011; Giusto, 2012; Mastrangelo dos santos, 2013; Mastrangelo & Ferrari, 2013), en las condiciones experimentales aquí utilizadas, requiere de un periodo de aclimatación relativamente prolongado previo a la realización de ensayos. No obstante, si bien inferior al 10%, en este medio se registra mortalidad y cierta variabilidad en las respuestas. La principal ventaja del MHW radica en que, al tratarse de un medio reproducible, permite una adecuada normatización del ensayo y posibilita posibles comparaciones tanto intra como inter-laboratorio con miras a futuras Inter calibraciones. Además, su dureza es la adecuada para el uso del Cd como tóxico de referencia en concentraciones sub-tóxicas relativamente elevadas y fácilmente cuantificables por métodos analíticos. Podemos afirmar entonces, que el MHW es aceptable para implementarse como control negativo para adultos de *C. decemmaculatus* en ensayos de exposición de extensión media.

En el medio control MHW, utilizado por primera vez como control en ensayos de este tipo para la especie, se establecieron los niveles homeostáticos basales de los distintos parámetros considerados como *endpoints* bajo las condiciones experimentales establecidas. Respecto a los biomarcadores estudiados en los organismos expuestos al medio control en MHW, hay que considerar que existe una fluctuación de valores esperados en algunos de estos, vinculados con la estacionalidad. Este comportamiento puede influir en la variabilidad de las respuestas obtenidas sobre dichos parámetros, aun en condiciones de laboratorio e independientes del medio externo. A partir de esto, se pudieron establecer valores basales de los biomarcadores estudiados para las condiciones de ensayo. El comportamiento estacional se pudo demostrar para la asimilación del alimento, A, que fue mayor en aquellos ejemplares utilizados durante las estaciones más frías (otoño y el invierno) respecto a aquellos organismos utilizados durante primavera y verano. Esta tendencia a la acumulación de reservas energéticas a partir de la dieta

ingerida principalmente en el ensayo de otoño, se manifiesta en un mayor crecimiento, es decir, en valores de SFG más elevados, índice biomarcador que también mostró un comportamiento estacional semejante al igual que la eficiencia de extracción de oxígeno. Resulta interesante que la estacionalidad de estos parámetros no se silencie en condiciones de cautiverio. Respecto a los biomarcadores de daño en el sistema nervioso y estrés oxidativo, la actividad de AChE mostró un aumento durante el verano, marcando un comportamiento estacional que condice con el ritmo circanual de esta enzima y para esta especie, ya demostrado por otros investigadores (Menendez-Helman, 2015). La actividad de GST y el contenido de GSH también mostraron un comportamiento diferente durante la época fría del año.

Los resultados obtenidos permitieron establecer una primera línea de base o valores basales de respuesta de *C. decemmaculatus* para las condiciones de experimentación establecidas a 12 días en MHW. Los mismos pueden servir como valores de referencia para nuevos estudios. Asimismo, se espera que los rangos de valores controles establecidos sean útiles para sentar bases futuras de trabajos comparativos con otros medios control y poblaciones silvestres procedentes de diferentes zonas.

El Cd como tóxico referente/ control positivo en el rango de concentraciones sub-tóxicas utilizadas en las condiciones experimentales ensayadas (0.5-0.8 mg Cd/l) resultó ser adecuado para poder caracterizar respuestas de efecto temprano sobre la especie prueba. El cloruro de cadmio (Cl_2Cd) como compuesto inorgánico para ser utilizado como tóxico referente en controles de calidad de agua, fue sugerido por diferentes agencias ambientales (US EPA, 2001) y es utilizado para juveniles de esta especie en ensayos agudos (de la Torre, *et al* 1997, Matrangelo & Ferrari, 2013).

En las condiciones de ensayo la letalidad del Cd a tiempo final de exposición alcanzó un máximo del 60%. Respecto a las respuestas de los diferentes *endpoints* analizados, y relativo a controles, en general, la presencia de Cd en solución produjo efectos diferenciales, así, los índices biométricos son menores que los controles y los biomarcadores de estrés oxidativo, si bien difíciles de interpretar, fueron diferenciables de

MHW. Además, el efecto por la exposición al Cd, parece influir sobre el ritmo circadiano de la actividad de AChE. En relación al balance energético es muy importante el efecto del Cd sobre el comportamiento alimentario y el SFG siempre de valores negativos, evidenciando que se encuentran comprometidas las reservas energéticas de los animales debido al medio de exposición.

En relación a las respuestas por exposición a Cd, la variabilidad no debe ser asumida como solo por el efecto de la exposición al metal, sino que además deben considerarse variables tales como el peso y la talla de los animales expuestos, dado que los efectos tóxicos del Cd muestran una gran variabilidad intraespecífica. En literatura recopilada existen valores muy variables de CL50 en estudios con toxicidad aguda del Cd, incluso a veces de diferentes órdenes de magnitud para la misma especie. También ciertas condiciones pueden influir en la respuesta al tóxico, como el sexo, la edad, etc. Considerando que nuestros ensayos fueron prolongados y con animales adultos, los resultados obtenidos parecen concordar con los referidos en la bibliografía (Eissa, 2010; Ferrari, 2011; Mastrángelo & Ferrari, 2013).

En vista que la postulación de un tóxico para su uso como referente, se basa en la caracterización de su efecto en la especie de ensayo, se espera contribuir a la validación del Cd como tóxico referente en bioensayos de toxicidad de efectos tempranos, sobre la base de sus efectos sobre parámetros biométricos, bioenergéticos y bioquímicos en adultos de *C. decemmaculatus* en condiciones controladas de laboratorio.

Respecto a las muestras ambientales, aunque el perfil físico-químico de las aguas provenientes de la cabecera del río Reconquista y su bajo grado de polución según los índices de calidad de agua y de efecto letal bajo (menor al 10 % con un leve aumento para el bioensayo de verano), los peces expuestos, no obstante, sufren desbalances en sus parámetros bioquímicos y metabólicos. Hay que tener en cuenta, además, que *C. decemmaculatus* suele vivir y reproducirse en la misma zona de muestreo, por lo que la alta sobrevivencia es esperable. La evaluación únicamente de parámetros físico-químicos de muestras complejas como sucede con las aguas receptoras del río Reconquista, es

insuficiente para una adecuada caracterización eco-toxicológica. Los muestreos puntuales solo aportan información parcial y se requieren programas de monitoreo prolongado, que integren la información proveniente de los diferentes enfoques, teniendo en cuenta factores como eventos contaminantes, las temporadas de lluvia y las variaciones de temperatura durante el año, ya que pueden influir sobre la calidad del agua, aportando incertidumbre a la interpretación de los efectos toxicológicos.

Los organismos expuestos a las muestras del río Reconquista, mostraron una variada respuesta en sus diferentes parámetros biomarcadores respecto a los organismos control. El IGS resultó ser el único biomarcador biométrico sensible, abriendo la posibilidad de indagar sobre posibles efectos reproductivos mediante el uso de otros parámetros no utilizados en este estudio. Por otra parte, la menor asimilación, TME y EEO, así como el incremento del catabolismo proteico y los menores valores de SFG en los animales expuestos al agua del río respecto al control negativo demuestra que se encuentran bajo una situación de estrés que provoca una deficiencia energética como resultante de ajustar su homeóstasis adaptativa frente a las condiciones estresantes en las que se encuentran y, en consecuencia, es esperable que sean más vulnerables a situaciones estresantes de distinta índole. Respecto a los biomarcadores bioquímicos, la actividad de AChE parece manifestar una disrupción de su comportamiento circadiano. En tanto que los biomarcadores de estrés oxidativo medidos muestran comportamientos disímiles. En este sentido, nuestros resultados y en comparación con los recabados en la bibliografía tanto para la misma especie como para otros teleósteos (de la Torre 1997, 2000; Ossana, 2018, 2019), demuestran que, utilizados de forma unitaria estos biomarcadores de estrés oxidativo en muchas ocasiones no resultan confiables, siendo recomendable su análisis de forma integrada. Si bien existe una importante variabilidad individual para los distintos biomarcadores utilizados, en general estos resultaron ser sensibles a la exposición al agua del río Reconquista. Se demuestra que la misma tiene un deterioro de su calidad con efecto sobre los peces que es factible de ser demostrado en laboratorio mediante un bioensayo protocolizado para la evaluación de efectos tempranos con adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* como organismo prueba.

En resumen, el uso correcto de las respuestas biológicas como biomarcadores, requiere de un conocimiento tanto de la variabilidad en ambiente natural y experimental para la especie, así como también del conocimiento de los posibles cambios estacionales sobre el metabolismo, los ciclos reproductivos y el estado nutricional, entre otros. La selección de diferentes biomarcadores y el potencial uso que se les pueda dar, está relacionado al tipo de metodología necesaria que debe considerarse antes de implementarlos en los programas de monitoreo, donde debería tenerse en cuenta el *estatus* homeostático de los organismos y la variabilidad que introducen los ciclos reproductivos, la disponibilidad del alimento y la variación temporal del ambiente. Agregamos a esto que es necesario contar con conocimientos acerca del comportamiento de los biomarcadores potenciales en condiciones experimentales. Los valores obtenidos sobre las variables biológicas para la obtención de una línea de base en condiciones controladas de laboratorio, constituyen una fuente importante de información clave acerca de la biología de *C. decemmaculatus* y su utilización como especie modelo en bioensayos ecotoxicológicos de efecto temprano.

Por otro lado, las respuestas bioquímicas en todos los tratamientos también se analizaron mediante la aplicación de un índice de respuesta de biomarcadores (IBR, de las siglas en inglés Integrated Biomarker Response). El IBR propuesto por Beliaeff & Burgeot (2002) y modificado por Devin & Burgeot (2012) sirve para resumir las respuestas de diferentes biomarcadores y simplificar su interpretación especialmente en programas de monitoreo y evaluaciones de riesgo ecológico, siendo una herramienta práctica y robusta para evaluar la susceptibilidad a diferentes medios de ensayo mediante el uso de múltiples respuestas de biomarcadores y que se visualizan mediante gráficos de estrella. A partir del análisis de estos resultados se pudo apreciar que prácticamente en todos los casos, las menores áreas fueron las obtenidas para los grupos control -MHW, mientras que por el contrario los grupos expuestos a Cd, fueron los que mayor variabilidad de respuesta tuvieron (mayor área del IBR). Por su parte, los grupos expuestos a las muestras ambientales RR presentaron valores intermedios y variables, manifestando así los diferentes efectos por exposición según cada estación ensayada. La elaboración del IBR fue una herramienta útil que permitió dar una visión integrada de las respuestas de los

biomarcadores bioquímicos bajo condiciones controladas de laboratorio, simplificando las situaciones de exposición, las cuales pueden ser complejas, debido a los efectos combinados de los contaminantes y las múltiples respuestas fisiológicas de los organismos de ensayo. Por otro lado, el campo de crecimiento o SFG (*Scope For Growth*) también resultó ser un índice importante: mediante la integración de los diferentes parámetros que lo componen permitió poner en evidencia el desbalance energético que los organismos sufren luego de estar expuestos a las diferentes muestras ambientales y particularmente a la exposición al Cd. Los animales sufren un desbalance a nivel metabólico debido a la falta de energía incorporada proveniente de la alimentación, así como también un mayor gasto energético por la exposición al tóxico. Cabe resaltar que el cálculo del SFG pudo realizarse y ponerse a punto por primera vez para esta especie, complementando así todos los datos biológicos anteriormente obtenidos por otros investigadores para *C. decemmaculatus*. El SFG resulta un biomarcador práctico para evaluar efectos ecofisiológicos tempranos en condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos mediante estos índices integrados pueden servir entonces como herramienta diagnóstica en la gestión del medio ambiente.

En resumen, en el IBR se evidenció un patrón e intensidad en la variabilidad de respuesta de los grupos expuestos al Cd, y también en menor medida, en los expuestos a las muestras ambientales del río, ello tanto con la incorporación o no de la AChE y proteínas de cerebro a la construcción del índice. Entonces, se puede concluir que este índice es útil para ser complementado con otros en estudios de monitoreo y ensayos toxicológicos. Comparando ambos índices utilizados en este trabajo, si bien el SFG refleja o denota un mejor efecto por la exposición a contaminantes, la desventaja que posee es que requiere del registro de parámetros a diario en condiciones experimentales por lo que es poco probable que su uso pueda ser aplicado en ensayos de campo. Se debe considerar que, el perfil fisicoquímico de las muestras ambiental repercute de manera particular sobre los ejemplares expuestos, pudiendo explicar por un lado los diferentes valores obtenidos de SFG para los grupos expuestos al agua del río además las diferencias entre las áreas obtenidas para los IBRs.

La ecotoxicología como disciplina científica se debe encargar de la búsqueda de soluciones para la problemática ambiental y en ese aspecto, los estudios sobre especies nativas son fundamentales para evaluar el riesgo ecológico ambiental. Se considera que la presente tesis es un aporte valioso para la ecotoxicología nacional, principalmente porque se utiliza un habitante nativo de la ictiofauna de la región que pretende sea validado y estandarizado para su utilización en la realización de estudios ambientales. Este estudio aporta información para proponer a la especie *Cnesterodon decemmaculatus* apta para utilizada como organismo modelo de ensayos ecotoxicológicos de efecto temprano con fines de monitoreo. La nueva información estudiada y recopilada en este trabajo, resulta de utilidad para la evaluación ecotoxicológica del agua dulce y se agrega a la ya existentes sobre la especie,

Esta tesis pretende generar un aporte a la ciencia, valorizando la observación de nuestros ambientes y buscando las herramientas para lograr un ambiente más saludable, generando nuevas líneas de investigación y aportar e integrar la nueva información a la ya existente.

Conclusiones

A partir de los diferentes objetivos planteados y los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis Doctoral se indican a continuación las conclusiones más relevantes.

- ✓ Se pudo establecer una primera línea de base para cada uno de los biomarcadores utilizados durante este trabajo en adultos de *C. decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a medio control MHW bajo condiciones controladas de laboratorio. Las mismas se han establecido como rango de valores esperables y corresponden a: parámetros morfométricos (FC, IHS, IGS), parámetros metabólicos (I, H, A, TME, EEO%, E, CA y SFG) y parámetros bioquímicos (AChE, CAT, GST y GSH). Estos rangos de valores pueden ser utilizados en futuros estudios como información de referencia de medio control.

- ✓ En medio control-MHW luego de 12 días de exposición, los siguientes biomarcadores demostraron tener un comportamiento estacional.
 - Asimilación -A.
 - Eficiencia de extracción de oxígeno -EEO%.
 - *Scope For Growth* -SFG.
 - Actividad de acetil-colinesterasa cerebral -AChE.
 - Actividad de Glutación -S-transferasa en hígado -GST.
 - Contenido de Glutación reducido en hígado -GSH.

Estos resultados adquieren una mayor relevancia al considerar que los animales utilizados en experimentación provienen de cultivos de laboratorio bajo condiciones estables de temperatura y fotoperiodo.

- ✓ Los parámetros físico-químicos y el cálculo de los dos índices de calidad del agua utilizados (ICAB e ICAPÍ) indicaron que la zona donde se realizó el muestreo del agua a utilizar en los ensayos, en las nacientes del río Reconquista, donde habita naturalmente la especie modelo utilizada en esta tesis, se encuentra levemente poluída. Así, si bien el agua del río no produce mortalidad por efecto de su exposición, se ha demostrado que, en las condiciones experimentales, animales no previamente expuestos a la misma, manifiestan alteraciones de diferentes parámetros metabólicos y bioquímicos demostrando así un deterioro de su estado de salud y consecuentemente, su mayor vulnerabilidad ante situaciones de estrés.
- ✓ El control positivo, realizado con un rango de concentración entre 0.5 y 0.8 mg Cd/l MHW resultó sub-tóxico para la especie y fue un medio capaz de producir efectos claramente diferenciables de los controles en MHW. Estos resultados permiten postular al Cd como tóxico de referencia adecuado para el protocolo de ensayo de evaluación de efecto temprano propuesto con la especie *C. decemmaculatus* como organismo modelo.

- ✓ El SFG resultó ser un biomarcador de balance energético sensible y una herramienta útil para utilizarse en ensayos de evaluación de efecto temprano en laboratorio. En esta tesis, por primera vez fue aplicado en un poecílido.
- ✓ La integración mediante el índice de respuesta de biomarcadores -IBR, permitió recopilar los diferentes parámetros bioquímicos facilitando la interpretación de las respuestas conjuntas de los organismos expuestos a los diferentes medios de ensayo y minimizando la variabilidad de respuesta.
- ✓ Se diseñó y puso a punto, para la especie, la metodología para los distintos parámetros metabólicos, los que se incorporan como biomarcadores de efecto a los clásicos biomarcadores bioquímicos.
- ✓ La especie *Cnesterodon decemmaculatus* es un excelente modelo animal para ser utilizado y validado como especie bio-indicadora en ensayos ecotoxicológicos.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, validan el protocolo experimental diseñado y desarrollado con la especie modelo para simular una situación de exposición a aguas receptoras, el que también es factible de usar con tóxicos puros o mezclas y que se detalla a continuación

Protocolo de ensayo de evaluación de efecto temprano en laboratorio para ecotoxicidad de aguas receptoras con adultos de *C. decemmaculatus* como modelo biológico

PARÁMETRO	CONDICIÓN
Tipo de ensayo	Semi-estático, con renovación parcial del medio cada 96 h
Medios de dilución de controles	Agua moderadamente dura (MHW) de acuerdo a EPA-1993 EPA/600/4-90/027F, Weber (1993) de la siguiente composición (mg/L de agua destilada): 60 SO ₄ Mg, 96 NaHCO ₃ , 4 KCl y 60 CaSO ₄ .2 H ₂ O. Es conveniente dejar estabilizar la solución durante 24 h previo a su uso. Se debe confirmar que los valores de pH y dureza se encuentren en el rango de 7,4 -7,8 y 80-100 mgCO ₃ Ca/l respectivamente.
Periodo de aclimatación	7-14 días en diluciones sucesivas a partir de agua de cultivo con MHW. Al inicio de esta etapa los animales se distribuyen aleatoriamente en las peceras y permaneces en ayunas durante las primeras 24 h.
Tiempo de exposición	12 días. Los animales no deben alimentarse durante el primer día de exposición.
Control fisicoquímico de los medios de ensayo	Registro de pH, OD, conductividad y dureza en las réplicas de manera previa y posterior a la renovación del medio.
Temperatura	23 ± 1°C
Condiciones del fotoperíodo	16 h luz/ 8 h oscuridad
Tipo de recipiente recomendado	Peceras de vidrio de 20x15x15 cm, no son aconsejables recipientes circulares.
Volumen de medio de exposición	2l/pecera
Numero de réplicas	mínimo de 2 por tratamiento
Carga de organismos	0.5 g/l aproximadamente
Edad de los organismos	Adultos de ambos sexos seleccionados al azar provenientes de cultivos de laboratorio. De no disponer de cultivos se pueden utilizar animales obtenidos de poblaciones naturales de sitios prístinos con una permanencia mínima de 40 días en condiciones de laboratorio.
Régimen de dieta	Una ración diaria de 2 % biomasa total /pecera durante el ensayo. "Ad libitum" durante la etapa de aclimatación.

número de ejemplares/réplica*	15 al inicio de la aclimatación.
<i>endpoints</i> de registro diario	Mortalidad, I, H, A
<i>endpoints</i> de tiempo final de exposición propuestos**	FC, IHS, IGS, EEO, TME, E, CA, AChE cerebral, biomarcadores de estrés oxidativo en hígado.
Índices de integración propuestos	SFG, IBR
criterio de aceptación	Mortalidad acumulada a tiempo final de exposición inferior al 10 % en control negativo y entre 30 y 60% en control positivo
Tratamiento de la muestra ambiental ***	Es recomendable seguir los procedimientos estipulados en USEPA (1993) <i>Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine. Fourth Edition. Ed: C. I. Weber y/o IRAM 29012-16. Calidad ambiental - Calidad del agua. Muestreo. Parte 16: Guía para el bioensayo de muestras (2003).</i>

* De disponer de suficientes animales y volumen de muestra, es recomendable diseñar el ensayo con dos sub-ensayos en paralelo: uno para registro de parámetros metabólicos y otros para registro de parámetros bioquímicos

** Se mencionan aquí solamente los utilizados y analizados en esta tesis. Cabe considerar que la elección de biomarcadores es abierta, y en ese sentido de manera paralela al presente estudio se han utilizado otros biomarcadores (ver Baudou *et al* 2017, 2019).

*** El diseño propuesto no contempla diluciones de las muestras ambientales. Sin embargo, se debe considerarse que con muestras desconocidas se debe realizar una prueba preliminar de evaluación de mortalidad previo al inicio del ensayo.

ANEXO CAPÍTULO 3

Anexo de Parámetros fisicoquímicos; métodos analíticos.

Parámetros fisicoquímicos de las muestras ambientales y medios de ensayo utilizados;

Métodos e Instrumentos utilizados para su determinación:

En todos los bioensayos se realizaron mediciones fisicoquímicas de los medios utilizados. En la siguiente tabla se describen los métodos utilizados, la expresión de los resultados y la metodología empleada.

Parámetro	Unidades	Metodología
pH		pHmetro Orion EA 940
Conductividad	$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	sensor Hanna HI 98240
Dureza	$\text{mg CaCO}_3\cdot\text{l}^{-1}$	Kit Merck 108039
Alcalinidad total	$\text{mg CaCO}_3\cdot\text{l}^{-1}$	Titulación con $\text{H}_2\text{SO}_4^{\text{a}}$
Cloruros	$\text{mg Cl}\cdot\text{l}^{-1}$	Titulación con AgNO_3^{a}
Oxígeno disuelto	$\text{mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$	Winkler ^a
Amonio	$\text{mg N-NH}_4^+\cdot\text{l}^{-1}$	Kit Merck 14752; colorimetría ^a
Nitritos	$\text{mg N-NO}_2^-\cdot\text{l}^{-1}$	Colorimetría ^a
Nitratos	$\text{mg N-NO}_3^-\cdot\text{l}^{-1}$	Kit Merck 14773; colorimetría ^a
Fosforo reactivo soluble (PRS)	$\text{mg P-PO}_4^{3-}\cdot\text{l}^{-1}$	Colorimetría ^a
Demanda biológica de oxígeno (DBO5)	$\text{mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$	Winkler ^a
Demanda química de oxígeno (DQO)	$\text{mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$	Kit Merck 14540
Metales pesados	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	EAA
Pesticidas	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Cromatografía gaseosa

Parámetros fisicoquímicos medidos y metodología empleada; ^a APHA, WWA, 2010.

- En campo (*in situ*):

Se midió temperatura, OD, pH y conductividad. Para medir la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Conductividad ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) y pH se utilizaron sensores de campo Hatch.

-En el laboratorio (*ex situ*):

Las muestras de agua del río Reconquista fueron recolectadas en botellas de plástico o vidrio (según la técnica) y refrigeradas para luego ser trasladadas al laboratorio (para las determinaciones de amonio, nitritos, nitratos y fosfatos, fueron filtradas con filtros Whatman GF/C 0.45 μm de poro) donde se realizaron las siguientes determinaciones:

- Oxígeno disuelto (método iodométrico de Winkler) (APHA, WWA, 2010; Lopretto & Tell, 1995):

Este método se basa en la reacción de los iones manganeso (II) en medio alcalino con el oxígeno disuelto, oxidando los hidróxidos de manganeso formados a valencias mayores (III). En medio fuertemente ácido los iones manganeso (III), oxidan el yoduro a I_2 en cantidad equivalente al oxígeno disuelto; éste último se titula con solución de tiosulfato de sodio (y el Mn vuelve a su estado divalente).

La botella de medición se llena cuidadosamente hasta rebalsar evitando la formación de burbujas. Se agregan 0.5 ml de MnSO_4 y 0.5 ml de solución iodada (50% p/v NaOH, 15% KI, 1% NaN_3), se agita y se deja reposar 1 minuto. Las muestras del agua del río se fijaron con estos reactivos y así se trasladaron en frío hasta el laboratorio donde inmediatamente se agregó 0.5 ml de H_2SO_4 concentrado y se mezcló por inversión varias veces hasta disolución completa. Se tituló con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.01N) un volumen de 20 mL de la solución anterior hasta obtener un color amarillo pálido. En ese punto se agregaron unas gotas de solución de almidón y se produjo viraje a color azul, se continuó la titulación hasta la desaparición del color azul. Siendo este el punto final de la titulación. La concentración de oxígeno de la muestra (en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) se calculó según la siguiente fórmula:

$$O_2 = (Vg * Nv * 8000) / Vf * (Ve - 1) / Ve$$

donde:

Vg= volumen de tiosulfato de sodio gastado

Nv= normalidad de la solución tituladora

Vf= volumen del frasco

Ve= volumen de titulación (20 ml)

La precisión de este método se estima en ± 50 mg/l.

- Alcalinidad (titulación con H_2SO_4) (APHA, WWA, 2010; Conzonno, 2010):

La alcalinidad es un parámetro que permite determinar las concentraciones de los bicarbonatos (HCO_3^-) y los carbonatos (CO_3^{2-}) del agua. En el análisis de aguas se determina la alcalinidad o capacidad de ácido hasta pH 8.2 y 4.3 de las bases débiles y fuertes disueltas por titulación con un ácido fuerte. La valoración acidimétrica se efectuó con ácido sulfúrico (0.2 N) frente a fenolftaleína (valor p, viraje a pH 8.2) y frente a un indicador mixto (valor m, viraje a pH 4.3). Los valores encontrados se indican como valores p y m positivos. En este estudio se reportan ambos valores de alcalinidad m o alcalinidad total.

Se utilizaron 100 ml de la muestra en un Erlenmeyer, se colocó el indicador fenolftaleína, si la muestra se torna color rosado se titula con H_2SO_4 hasta que viraje a incoloro. Luego se agregan unas gotas del indicador mixto, la muestra ahora es color celeste y se sigue titulando hasta que vire a un color anaranjado.

Se realizó el cálculo de alcalinidad expresándola como mg $CaCO_3/L$ con la siguiente fórmula:

$$mg \text{ CaCO}_3 \cdot L^{-1} = ml \text{ H}_2\text{SO}_4 * N * F * 50000 / ml \text{ muestra}$$

donde:

N= normalidad de la solución titulante de H_2SO_4

F= factor de la solución titulante de H_2SO_4

- Dureza (Kit Merck 108039):

Se entiende por dureza total del agua la suma de las durezas individuales, que se deben a los iones alcalinotérreos Ca, Mg, Sr y Ba. Como en el agua el Sr y Ba en general se encuentran en concentraciones traza, la dureza total se debe principalmente a la suma de las durezas individuales de los iones Ca y Mg. Se determinó la misma mediante la valoración complejométrica con Titriplex® III (sal sódica del ácido etilendinitrilotetraacético) frente a un indicador mixto. El indicador mixto, igualmente ligado a dichos iones por enlaces de tipo complejo, esta coloreado de rojo. Al añadir Titriplex, se libera el indicador, que vira de rojo a verde, pasando por verde grisáceo.

Se tomaron 5 ml de la muestra de agua a analizar y se añadieron 3 gotas de la solución indicadora agitando. Lentamente y agitando por balanceo, gotear luego la solución tituladora hasta que viraje de color. La dureza total de la muestra se indicó como mg de $CaCO_3/L$.

- Cloruros (titulación con $AgNO_3$) (APHA, WWA, 2010; Conzonno, 2010):

Para la determinación de iones cloruros en una muestra de agua, en una solución levemente alcalina o neutra el cromato de potasio puede indicar el punto final de la titulación con nitrato de plata ($AgNO_3$) del ión cloruro. El cloruro de plata precipita cuantitativamente cuando el cromato de plata se forma (color rojo).

Se utilizaron 100 ml de la muestra, se agregaron unas gotas del indicador cromato de potasio ($KCrO_4$) y se tituló con $AgNO_3$ 0.1 N. Se realiza un blanco titulando agua mili-Q.

Se determinó la concentración de cloruros mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mg Cl}^-/\text{L} = (\text{A}-\text{B}) * \text{N} * 35450 / \text{ml muestra}$$

donde:

A= ml de AgNO₃ utilizados con la muestra

B= ml de AgNO₃ utilizados con agua mili-Q

N= normalidad del AgNO₃

- Amonio (Kit Merck 14752 o APHA, WWA, 2010):

El nitrógeno amónico (NH₄-N) se presenta en forma de iones amonio y en parte en forma de amoníaco. Entre ambas formas existe un equilibrio dependiente del pH. En solución fuertemente alcalina, en la que prácticamente existe amoníaco, tiene lugar con un agente colorante una transformación en monocloroamina. Ésta forma con timol un derivado azul de indofenol que se determina fotométricamente.

En algunas muestras no se utilizó el Kit y la concentración de amonio se realizó de la siguiente manera (APHA, WWA, 2010):

El amonio reacciona con fenol e hipoclorito en medio alcalino para dar azul de indofenol, reacción catalizada por nitroprusiato. La intensidad del color resultante es proporcional a la concentración de amonio presente y es medida espectrofotométricamente a 635 nm.

Se colocan 50 ml de la muestra y se le agregan 2 ml de fenol-nitroprusiato y 2 ml de hipoclorito alcalino. Se mezcla y se deja en un baño a 25°C durante 1 hora, preferentemente en oscuridad. En forma paralela se realiza un blanco de reactivos, utilizando 50 ml de agua mili-Q y una curva de patrones por diluciones convenientes de la solución patrón de NH₄⁺. Los patrones se preparan a partir de una solución madre de 100 µg N (122 µg NH₃). De esta solución se prepara una solución hija de 0.5 µg N de la cual se preparan en el momento los patrones (20; 50; 100; 200 y 500 µg NH₃-N.l⁻¹). Se leen las absorbancias del color resultante en un espectrofotómetro a 635 nm.

- Nitritos (colorimétrico) (APHA, WWA, 2010):

Se colocan 50 ml de la muestra en Erlenmeyer y se agrega 2 ml de solución de sulfanilamida (ácido fosfórico 85%, 1% sulfanilamida, 0.1% N-(1-naftil)-etilendiamina). Se incuba a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 543 nm luego de los 10 minutos y dentro de las 2 h.

Se realiza una curva de calibración con una solución patrón de NO_2Na de 250 $\mu\text{g N}$. De esta solución se prepara en el día una hija de 50 $\mu\text{g N}$ de concentración y de esta se prepara una nieta de 0.5 $\mu\text{g N}$ con la cual se hacen patrones de 0.01; 0.02; 0.05; 0.1 y 0.5 mg N.l^{-1} .

- Nitratos (Kit Merck 14773), cuando se midió:

En ácido sulfúrico concentrado los iones nitrato forman con un derivado del ácido benzoico un nitrocompuesto rojo que se determina fotométricamente. En algunas muestras no se utilizó el Kit y la concentración de nitratos se realizó de la siguiente manera (APHA, WWA, 2010): El nitrato es reducido a nitrito en presencia de cadmio. Luego es el nitrito el que se determina colorimétricamente. De la suma de los nitratos + nitritos de la muestra original luego se descuentan los nitritos. Las determinaciones se realizaron al día siguiente del muestreo. La columna de cadmio fue regulada para que el flujo continuo sea entre 7 y 10 ml por minuto. Las muestras se pasaron desde las que tenían menor a mayor concentración de nitratos por la columna de cadmio. Se pasan 75 ml de muestra por la columna, se descartan los primeros 25 ml y se recuperan los siguientes 50 ml a los cuales se les agrega los reactivos mencionados arriba para determinar nitritos. Se trasvasa a un Erlenmeyer y antes de que transcurran los 15 minutos de la reducción se agrega 2 ml de solución de sulfanilamida. Se lee en espectrofotómetro la absorbancia a 543 nm luego de 10 minutos y antes de las 2 h.

Se prepararon estándar de nitritos con un estándar reducido de nitratos de la misma concentración para verificar la eficiencia reductora de la columna de cadmio.

Los patrones que se hacen para nitratos son, además del blanco, de 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mg.l⁻¹ de N-NO₃ y los patrones de nitritos son de 0.02, 0.1 y 0.5 mg.l⁻¹ de N-NO₂.

Para calcular los valores se fabrica la curva de calibración con los datos de concentración de patrones y absorbancias, se calcula la ecuación de la recta y con los valores de absorbancia de la muestra se calculan las concentraciones. Al valor de concentración de nitratos que se obtiene de esa cuenta hay que restarle el valor de concentración de nitritos.

- Fosfatos (colorimétrico) (APHA, WWA, 2010):

El método se basa en la reacción del ión fosfato con molibdato amónico y tartrato doble de antimonio y potasio que en medio ácido forman un compuesto que es reducido a azul de molibdeno por el ácido ascórbico.

Se toman 25 ml de la muestra de agua del río, se le agrega una gota de fenolftaleína, 4 ml del reactivo mixto que se prepara en el momento (15 v/v molibdato amónico; 50 v/v ácido sulfúrico 5 N; 30 v/v ácido ascórbico; 5 v/v tartrato de Sb y K) se agita y se incuba a temperatura ambiente de 10 a 30 minutos y se lee la absorbancia a 880 nm.

Se hace una curva de calibración con una solución madre de PO₄H₂K de 50 µg-P de la cual se prepara en el momento una solución hija de 2.5 µg-P con la cual se preparan patrones de 0.15; 0.25; 0.5; 0.75; 1 y 1.25 mg P.l⁻¹.

- Demanda biológica de oxígeno (DBO) (APHA, WWA, 2010; Lopretto & Tell, 1995):

La DBO informa sobre el consumo de oxígeno necesario para la degradación bioquímica de los componentes orgánicos de la muestra de agua y el requerido para oxidar algunas sustancias (sulfuros, Fe²⁺), y formas reducidas del nitrógeno por la acción de microorganismos, en un período de 5 días (DBO₅) a 20°C y en oscuridad.

Se realizó, de acuerdo con el tipo de muestra, una sola dilución o dos (25% y 50%) siempre por duplicado. La dilución se realizó en una solución buffer preparada 48 h antes del muestreo y el mismo día del muestreo se realizaba la DBO.

Con las diluciones se llenaban 4 botellas de 300 ml de capacidad, evitando la formación de burbujas. Dos de ellas se cerraban inmediatamente y se guardaban en oscuridad en cámara a 20° C durante 5 días. Con las otras dos se determinaba la concentración de oxígeno inicial. Así mismo se realizaron controles colocando en botellas de 300 ml solamente la solución buffer, midiendo también el oxígeno inicial y final.

En cada uno de los frascos se determinó el contenido de oxígeno disuelto por el método de Winkler anteriormente descrito. Se calculó el consumo de oxígeno para cada dilución según la siguiente formula:

$$DBO_5 = [(Od_i - Od_f) - (B_i - B_f)]/p$$

donde:

Od_i: oxígeno disuelto inicial

Od_f: oxígeno disuelto final

B_i: blanco dilución inicial

B_f: blanco dilución final

p: dilución realizada. Para el control p=1, para una dilución del 50% p= 0.5

- Demanda química de oxígeno (DQO) (Kit Merck 14540):

Es una medida indirecta de la materia orgánica contenida en una muestra de agua susceptible de ser oxidada por un agente químico oxidante.

La muestra se digirió en caliente con K₂Cr₂O₇ en H₂SO₄, y AgSO₄ como catalizador. El exceso de iones Cr₂O₇ se determinó espectrofotométricamente.

Las determinaciones se realizaron sobre las muestras de agua sin filtrar, previamente homogeneizadas. Si la muestra no se analizaba al día siguiente del muestreo se acidificaba con H₂SO₄ cc y se analizaba a la semana. Se agregó 3 ml de la muestra en la cubeta de reacción conteniendo la solución ácida de K₂Cr₂O₇ y se mezcló bien. La cubeta se calentó

en el termorreactor a 148° C durante 2 h. Posteriormente se retiró del termorreactor y se dejó enfriar.

Antes de realizar la medición se agitaron las muestras y por lectura a 585 nm contra blanco (agua mili-Q) se obtuvieron valores para expresar los resultados en mg O₂/L.

En algunas muestras no se utilizó el Kit y la DQO se realizó de la siguiente manera (APHA, WWA, 2010):

Las muestras se tomaron de la misma forma y se acidificaron con H₂SO₄ cc si se analizaban a la semana del muestreo. El principio es el mismo, se trató la muestra con K₂Cr₂O₇ en caliente 148° C durante 2 h y luego de esta digestión el K₂Cr₂O₇ que no fue reducido se tituló con Fe (NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 25 M y la materia orgánica oxidada fue calculada en termino de equivalentes de O₂.

- Metales pesados:

Sobre las muestras tomadas, acidificadas a pH ≤ 2 con HNO₃ y conservadas en frío se determinó el contenido de metales pesados disueltos por espectrofotometría de absorción atómica.

Para la determinación de Cobre:

Se utilizó un Espectrómetro de Absorción Atómica SHIMADZU 6800 con horno de grafito GFA 6000 y muestreador automático ASC 6000, con lámpara de cátodo hueco de cobre Hamamatsu Photonics.

Reactivos:

- Agua de baja conductividad
- Solución stock de 1000 mg/l de Cu.
- Ácido Nítrico Suprapur

Se prepararon soluciones patrones de 10 y 100 mg/l de Cu de la solución stock. A partir de estas soluciones se prepararon una serie de patrones de 0,5; 1,0; 2,0 y 4,0 mg/l de Cu. Estas últimas soluciones con una concentración final de HNO₃ 0,1 % p/v. En todos los casos se utilizó agua de baja conductividad para la preparación de las soluciones.

Parámetros Instrumentales:

- Longitud de onda: 324,7 nm
- Intensidad de corriente de la lámpara: 6 mA
- Ancho de ranura: 0,5 nm
- Combustible: acetileno.
- Oxidante: aire
- Tipo de llama: oxidante.

Para la determinación de Cadmio:

Se utilizó un espectrómetro de Absorción Atómica SHIMADZU 6700 con horno de grafito GFA 6000 y muestreador automático ASC 6000 con lámpara de cátodo hueco de cadmio Hamamatsu Photonics. Los límites de cuantificación y detección fueron 0,001 y 0,0003 mg/L, respectivamente.

Reactivos:

- Agua de baja conductividad
- Solución stock de 1000 mg/l de Cd.
- Ácido Nítrico Suprapur

Se prepararon soluciones patrones de 0,1 y 0,0100 mg/l de Cd de la solución stock. A partir de estas soluciones se preparó una serie de patrones de 0,5; 1; 2; y 3 µg/l de Cd. Estas últimas con una concentración final de HNO₃ 0,1 % p/v. En todos los casos se utilizó agua de baja conductividad para la preparación de las soluciones.

Parámetros Instrumentales:

- Longitud de onda: 228,8 nm
- Intensidad de corriente de la lámpara: 8 mA
- Ancho de ranura: 0,5 nm

Para la determinación de Cromo:

Se utilizó un espectrómetro de Absorción Atómica SHIMADZU 6700 con horno de grafito GFA 6000 y muestreador automático ASC 6000, con lámpara de cátodo hueco de cromo Hamamatsu Photonics.

Reactivos:

- Agua de baja conductividad
- Solución stock de 1000 mg/l de Cr.
- Ácido Nítrico Suprapur

Se prepararon soluciones patrones de Cr de 1 y 0,100 mg/l a partir de la solución stock. A partir de estas soluciones se preparó una serie de patrones de 2; 5; 10 y 20 µg/l de Cr. Estas últimas soluciones con una concentración final de HNO₃ 0,1 % p/v. En todos los casos se utilizó agua de baja conductividad para la preparación de las soluciones.

Parámetros Instrumentales:

- Longitud de onda: 357,9 nm
- Intensidad de corriente de la lámpara: 12 mA
- Ancho de ranura: 0,2 nm.

Para la determinación de Plomo:

Se utilizó un espectrómetro de Absorción Atómica SHIMADZU 6700 con horno de grafito GFA 6000 y muestreador automático ASC 6000, con lámpara de cátodo hueco de plomo Hamamatsu Photonics.

Reactivos:

- Agua de baja conductividad
- Solución stock de 1000 mg/l de Pb.
- Ácido Nítrico Suprapur

Se prepararon soluciones patrones de Pb de 1 y 0,100 mg/l de una solución stock. A partir de estas soluciones se prepararon patrones de 5; 10; 20 y 50 µg/l de Pb. Estas últimas soluciones con una concentración final de HNO₃ 0,1 % p/v. En todos los casos se utilizó agua de baja conductividad para la preparación de las soluciones.

Parámetros Instrumentales:

Longitud de onda: 283,3 nm

Intensidad de corriente de la lámpara: 10 mA

Ancho de ranura: 0,5 nm.

Para la determinación de Arsénico:

Se utilizó un espectrómetro de Absorción Atómica SHIMADZU 6700 por generación de hidruros, accesorio de horno de grafito GFA 6000 y muestreador automático ASC 6000 y lámpara de cátodo hueco de arsénico Hamamatsu Photonics.

Reactivos:

Agua de baja conductividad

Solución stock de 1000 mg/l de As.

Ácido Nítrico Suprapur

Soluciones patrones de As: a partir de una solución stock se obtienen soluciones de 1 y 0,100 mg/l. A partir de estas soluciones se preparan una serie de patrones que contengan 10, 20, 30 y 50 $\mu\text{g/l}$ de As, con una concentración final de HNO_3 0,1 % p/v.

Parámetros Instrumentales

Longitud de onda: 193,7 nm

Intensidad de corriente de la lámpara: 12 mA

Ancho de ranura: 0,2 nm

- Plaguicidas:

Sobre las muestras tomadas con botella de vidrio color caramelo y conservadas en frío se determinaron una serie de pesticidas organoclorados y organofosforados mediante cromatógrafo de capilaridad por gas de alta resolución en un equipo Hewlett Packard; 61530 Plus A6890, equipado con detectores de captura apropiados (ECD, FPD y NPD). El límite de detección fue de 0.01 a 0.03 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Todas las muestras dieron por debajo del límite de detección para los siguientes pesticidas:

Endrin

D.D.T. y Metabolitos

Dieldrin

Heptacloro
Heptacloro epóxido
Hexaclorobenceno
Lindano
alfa-HCH
Aldrin
beta-HCH
alfa-clordano
beta-clordano
gama-clordano
alfa-endosulfán
beta-endosulfán
Mirex
Metoxicloro (dodecacloro)
Bromofos
Clorfenvinfos
Clorpirifós
Coumafos
Diazinón
Etil-bromofós
Etion
Fenitrotión
Metil-paratión
Malatión.

ANEXO CAPÍTULO 4

Estadística descriptiva obtenida para el porcentaje de Mortalidad acumulada luego de 12 días de exposición:

medidas resumen:						
Estación	Tratamiento	Variable	n	media	S.D.	S.E.
Primavera	MHW	% mort acumulada	5	7,22	11,04	4,94
	Cd	% mort acumulada	5	57,06	12,72	5,69
	RR	% mort acumulada	4	6,25	12,5	6,25
Verano	MHW	% mort acumulada	9	8,67	6,04	2,01
	Cd	% mort acumulada	9	35,73	19,16	6,39
	RR	% mort acumulada	8	17,31	7,73	2,73
Otoño	MHW	% mort acumulada	13	7,56	7,6	2,11
	Cd	% mort acumulada	5	59,56	20,59	9,21
	RR	% mort acumulada	8	4,03	8,14	2,88
Invierno	MHW	% mort acumulada	7	3,31	4,14	1,57
	Cd	% mort acumulada	7	45,23	21,54	8,14
	RR	% mort acumulada	6	4,29	7,07	2,89

Estadística descriptiva obtenida para la concentración efectiva del Cd utilizado en cada uno de los ensayos:

Medidas resumen				
Ensayo	Tratamiento	n	Promedio (mg/l)	D.S.
Primavera	Cd	62	0,46	0,04
	MHW	39	$9,7 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^{-4}$
Verano	Cd	60	0,78	0,24
	MHW	11	0,03	0,02
Otoño	Cd	67	0,74	0,11
	MHW	21	0,01	0,02
Invierno	Cd	58	0,76	0,08
	MHW	35	0,08	0,09

ANOVA con comparaciones de Bonferroni realizado para el análisis de mortalidad acumulada a 12 días de exposición:

Análisis de la varianza: Bonferroni (Paramétrico)					
Estación	Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
INVIERNO	% mort acum	20	0,71	0,68	74,33
Analysis of variance table (Partial SS)					
S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	7827,42	2	3913,71	21,21	<0,0001
Tratamiento	7827,42	2	3913,71	21,21	<0,0001
Error	3137,31	17	184,55		
Total	10964,74	19			
Test:Bonferroni Alpha:=0,05 LSD:=19,80728					
Error: 184,5479 df: 17					
Tratamiento	Means	n	S.E.		
MHW	3,31	7	5,13	A	
RR	4,29	6	5,55	A	
Cd	45,23	7	5,13		B
Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)					
Estación	Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
OTOÑO	% mort acum	26	0,8	0,78	67,59
Analysis of variance table (Partial SS)					
S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	11552,38	2	5776,19	46,58	<0,0001
Tratamiento	11552,38	2	5776,19	46,58	<0,0001
Error	2851,93	23	124		
Total	14404,31	25			
Test:Bonferroni Alpha:=0,05 LSD:=14,88299					
Error: 123,9968 df: 23					
Tratamiento	Means	n	S.E.		
RR	4,03	8	3,94	A	
MHW	7,56	13	3,09	A	
Cd	59,56	5	4,98		B
Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)					
Estación	Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
PRIMAVERA	% mort acum	14	0,84	0,81	48,79
Analysis of variance table (Partial SS)					
S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	8124,19	2	4062,09	27,87	<0,0001
Tratamiento	8124,19	2	4062,09	27,87	<0,0001
Error	1603,28	11	145,75		
Total	9727,47	13			
Test:Bonferroni Alpha:=0,05 LSD:=22,41168					
Error: 145,7532 df: 11					
Tratamiento	Means	n	S.E.		
RR	6,25	4	6,04	A	
MHW	7,22	5	5,4	A	
Cd	57,06	5	5,4		B
Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)					
Estación	Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
VERANO	% mort acum	26	0,48	0,44	60,85
Analysis of variance table (Partial SS)					
S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	3428,5	2	1714,25	10,81	0,0005
Tratamiento	3428,5	2	1714,25	10,81	0,0005
Error	3647,2	23	158,57		
Total	7075,7	25			
Test:Bonferroni Alpha:=0,05 LSD:=15,64347					
Error: 158,5739 df: 23					
Tratamiento	Means	n	S.E.		
MHW	8,67	9	4,2	A	
RR	17,31	8	4,45	A	
Cd	35,73	9	4,2		B
Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)					

Mediciones del set de parámetros físico-químicos en diferentes réplicas durante los bioensayos del experimento:

Ensayo	Tratamiento	Variabes	n	Promedio	D.S.	C.V.
Primavera	Cd	pH	10	7,38	0,12	1,65
		O2 (mg/ml)	10	7,49	0,39	5,27
		Conductividad (μS/cm)	10	327,9	15,19	4,63
		Dureza (mg/L)	10	97	4,22	4,35
	MHW	pH	9	7,44	0,16	2,15
		O2 (mg/ml)	9	7,81	0,3	3,9
		Conductividad (μS/cm)	9	316,89	10,56	3,33
		Dureza (mg/L)	9	93,33	4,33	4,64
	RR	pH	4	7,51	0,02	0,33
		O2 (mg/ml)	4	7,16	0,27	3,72
		Conductividad (μS/cm)	4	214,93	3,8	1,77
		Dureza (mg/L)	4	26,25	2,5	9,52
Verano	Cd	pH	48	7,99	0,42	5,28
		O2 (mg/ml)	58	7,39	0,44	5,95
		Conductividad (μS/cm)	45	344,49	63,42	18,41
		Dureza (mg/L)	5	95,2	8,44	8,86
	MHW	pH	80	8,11	0,39	4,8
		O2 (mg/ml)	80	7,2	0,51	7,14
		Conductividad (μS/cm)	80	332,7	56,65	17,03
		Dureza (mg/L)	12	92,17	5,15	5,59
	RR	pH	34	8,25	0,19	2,32
		O2 (mg/ml)	33	6,88	0,61	8,81
		Conductividad (μS/cm)	34	854,88	69,73	8,16
		Dureza (mg/L)	6	82	4,9	5,97
Otoño	Cd	pH	30	8,06	0,27	3,39
		O2 (mg/ml)	30	8,65	0,5	5,77
		Conductividad (μS/cm)	28	328,68	20,12	6,12
		Dureza (mg/L)	2	94	2,83	3,01
	MHW	pH	55	8,33	0,27	3,25
		O2 (mg/ml)	55	8,82	0,3	3,41
		Conductividad (μS/cm)	55	424,78	81,55	19,2
		Dureza (mg/L)	12	96,5	26,52	27,48
	RR	pH	43	8,16	0,18	2,24
		O2 (mg/ml)	43	8,78	0,33	3,72
		Conductividad (μS/cm)	43	871,3	81,52	9,36
		Dureza (mg/L)	3	86	6	6,98
Invierno	Cd	pH	34	8,08	0,34	4,16
		O2 (mg/ml)	34	7,98	0,69	8,71
		Conductividad (μS/cm)	0	nd	nd	nd
		Dureza (mg/L)	16	87,1	8,72	6,54
	MHW	pH	37	8,02	0,35	4,35
		O2 (mg/ml)	37	7,95	0,86	10,81
		Conductividad (μS/cm)	0	nd	nd	nd
		Dureza (mg/L)	16	87,06	8,72	10,02
	RR	pH	29	8,46	0,46	5,46
		O2 (mg/ml)	29	7,89	0,85	10,81
		Conductividad (μS/cm)	0	nd	nd	nd
		Dureza (mg/L)	0	nd	nd	nd

ANEXO CAPÍTULO 5

Línea de base

Biomarcadores biométricos: Medidas resumen; estadística descriptiva del peso, talla, peso gonadal, IGS, HSI y FC:

Primavera 2014													
Resumen	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	P(10)	P(50)	P(90)
peso	19	101,12	47,1	10,81	46,58	31,11	169,91	99	58,01	150,73	34,28	99	160,52
talla	19	24,55	4,3	0,99	17,51	17,93	31,85	24,46	21	28,54	17,94	24,46	30,87
FC	19	0,64	0,13	0,03	20,32	0,46	1,02	0,61	0,54	0,72	0,52	0,61	0,82
HSI	19	1,59	0,87	0,2	54,98	0,53	3,42	1,37	0,81	2,4	0,64	1,37	2,88
IGS													
peso G													
Verano 2017													
Resumen	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	P(10)	P(50)	P(90)
peso	20	94,96	45,25	10,12	47,66	28,27	168,32	85,81	64,26	135,84	29,27	82,31	146,25
talla	20	21,94	5,06	1,13	23,05	10,81	29,11	22,25	17,79	25,22	13	21,39	28,1
FC	20	1,12	1,21	0,27	108,09	0,5	5,09	0,71	0,59	0,88	0,5	0,69	1,19
HSI	20	1,68	0,9	0,2	53,73	0,54	3,75	1,57	0,81	2,13	0,61	1,51	2,71
IGS	13	0,9	0,93	0,26	102,92	0,34	3,79	0,48	0,46	0,85	0,35	0,48	1,57
peso G	20	94,25	44,71	10	47,44	28,27	168,32	85,42	64,04	134,79	29,27	81,92	144,55
Otoño 2016													
Resumen	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	P(10)	P(50)	P(90)
peso	22	125,98	33,52	7,15	26,61	70,76	187,35	120	106,12	149,52	80,29	114,6	170,4
talla	22	25,75	2,29	0,49	8,9	22,34	30,26	25,51	23,8	27,45	23,13	25,18	29
FC	22	0,73	0,09	0,02	12,29	0,57	0,95	0,71	0,67	0,78	0,62	0,7	0,81
HSI	22	1,69	0,64	0,14	37,87	0,9	3,48	1,54	1,3	1,98	0,96	1,51	2,55
IGS	20	0,66	0,25	0,06	38,15	0,35	1,2	0,62	0,42	0,84	0,39	0,61	1,01
peso G	20	127,89	32,41	7,25	25,34	70,65	185,45	125,25	105,64	148,94	79,8	113,23	168,96
Invierno 2015													
Resumen	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	P(10)	P(50)	P(90)
peso	15	135,88	33,38	8,62	24,56	69,69	188,55	137,8	104,68	156,67	99,9	137,8	182,75
talla	15	27,31	2,15	0,56	7,88	22,83	31,81	27,43	26,61	28,3	24,07	27,43	29,78
FC	15	0,66	0,1	0,03	14,98	0,48	0,83	0,67	0,59	0,73	0,53	0,67	0,79
HSI	15	1,22	0,55	0,14	44,7	0,59	2,59	1,17	0,77	1,52	0,61	1,17	1,87
IGS	14	0,75	0,34	0,09	45,08	0,39	1,79	0,7	0,59	0,73	0,49	0,69	1,11
peso G	15	134,91	33,12	8,55	24,55	69,69	187,18	136,85	104,27	155,74	98,11	136,85	181,56

Tablas de frecuencias y distribución de datos en clases:**Talla**

Distribución de datos en clases						
estación	clase 1	clase 2	clase 3	clase 4	clase 5	clase 6
primavera	5	4	4	5	1	4
verano	2	2	1	6	3	0
otoño	0	0	7	8	5	2
invierno	0	0	2	4	7	2
total	7	6	14	23	16	8
% primavera	0,71	0,67	0,29	0,22	0,06	0,5
%verano	0,29	0,33	0,07	0,26	0,19	0
%otoño	0,00	0,00	0,50	0,35	0,31	0,25
%invierno	0,00	0,00	0,14	0,17	0,44	0,25

Peso

Distribución de datos en clases						
estación	clase 1	clase 2	clase 3	clase 4	clase 5	clase 6
primavera	3	5	2	3	5	1
verano	4	4	2	2	5	1
otoño	0	3	4	5	7	3
invierno	0	1	3	2	6	3
total	7	13	11	12	23	8
% primavera	0,43	0,38	0,18	0,25	0,22	0,13
%verano	0,57	0,31	0,18	0,17	0,22	0,13
%otoño	0,00	0,23	0,36	0,42	0,30	0,38
%invierno	0,00	0,08	0,27	0,17	0,26	0,38

FC

Distribución de datos en clases						
estación	clase 1	clase 2	clase 3	clase 4	clase 5	clase 6
primavera	6	7	5	0	1	0
verano	4	6	4	1	1	2
otoño	1	10	9	1	1	0
invierno	3	6	5	1	0	0
total	14	29	23	3	3	2
% primavera	0,43	0,24	0,22	0,00	0,33	0,00
%verano	0,29	0,21	0,17	0,33	0,33	1,00
%otoño	0,07	0,34	0,39	0,33	0,33	0,00
%invierno	0,21	0,21	0,22	0,33	0,00	0,00

HSI

Distribución de datos en clases						
estación	clase 1	clase 2	clase 3	clase 4	clase 5	clase 6
primavera	7	5	1	4	1	1
verano	6	4	5	1	1	1
otoño	3	9	5	4	0	1
invierno	6	6	2	1	0	0
total	22	24	13	10	2	3
primavera	0,32	0,21	0,08	0,40	0,50	0,33
verano	0,27	0,17	0,38	0,10	0,50	0,33
otoño	0,14	0,38	0,38	0,40	0,00	0,33
invierno	0,27	0,25	0,15	0,10	0,00	0,00

Peso gonadal

Distribución de datos en clases						
estación	clase 1	clase 2	clase 3	clase 4	clase 5	
verano	1	5	2	5	2	
otoño		3	7	6	4	
invierno			5	6	3	
total	1	8	14	17	9	
%verano	1,00	0,63	0,14	0,29	0,22	
%otoño	0,00	0,38	0,50	0,35	0,44	
%invierno	0,00	0,00	0,36	0,35	0,33	

IGS

Distribución de datos en clases						
estación	clase 1	clase 2	clase 3	clase 4	clase 5	
verano	9	1	1	1	1	
otoño	19	1	1	1		
invierno	12	1	0	0		
total	40	3	2	3	1	
%verano	0,23	0,33	0,50	0,33	1,00	
%otoño	0,48	0,33	0,50	0,33	0,00	
%invierno	0,30	0,33	0,00	0,00	0,00	

Metabolismo Energético:**Tablas de frecuencias y distribución de datos en clases:****Ingesta**

Distribución de datos en clases							
estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4	clase 5	clase 6	clase 7
prim	2	6	9	12	8	7	4
ver	13	17	13	11	2	0	0
otoño	2	2	7	12	14	21	3
invierno	1	8	12	6	5	1	0
total	18	33	41	41	29	29	7
%prim	0,11	0,18	0,22	0,29	0,28	0,24	0,57
%ver	0,72	0,52	0,32	0,27	0,07	0,00	0,00
%otoño	0,11	0,06	0,17	0,29	0,48	0,72	0,43
%invierno	0,06	0,24	0,29	0,15	0,17	0,03	0,00

Heces

distribución de grupos en clases							
estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4	clase 5	clase 6	clase 7
prim	6	13	13	7	6	1	3
ver	13	21	19	1	0	0	1
otoño	9	40	11	0	0	0	0
invierno	8	16	8	3	0	0	0
total	36	90	51	11	6	1	4
%prim	0,17	0,14	0,25	0,64	1,00	1,00	0,75
%ver	0,36	0,23	0,37	0,09	0,00	0,00	0,25
%otoño	0,25	0,44	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00
%invierno	0,22	0,18	0,16	0,27	0,00	0,00	0,00

Asimilación

distribución de grupos en clases							
Estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4	clase 5	clase 6	clase 7
prim	3	2	11	14	10	4	4
ver	1	16	18	12	8	1	0
otoño	0	2	3	15	11	16	14
invierno	0	1	11	9	9	2	1
total	4	21	43	50	38	23	19
%prim	0,75	0,10	0,26	0,28	0,26	0,17	0,21
%ver	0,25	0,76	0,42	0,24	0,21	0,04	0,00
%otoño	0,00	0,10	0,07	0,30	0,29	0,70	0,74
%invierno	0,00	0,05	0,26	0,18	0,24	0,09	0,05

EEO

Distribución de grupos en clases					
Estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4	clase 5
prim	10	2	0	0	0
ver	4	3	2	1	1
otoño	0	5	4	2	0
invierno	0	2	4	2	2
total	14	12	10	5	3
%prim	0,71	0,17	0,00	0,00	0,00
%ver	0,29	0,25	0,20	0,20	0,33
%otoño	0,00	0,42	0,40	0,40	0,00
%invierno	0,00	0,17	0,40	0,40	0,67

Tasa Metabólica Específica (TME)

Distribución de grupos en clases					
Estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4	clase 5
prim	0	4	4	0	0
ver	3	3	2	1	0
otoño	0	2	4	1	3
invierno	2	4	1	0	0
total	5	13	11	2	2
%prim	0,00	0,31	0,36	0,00	0,00
%ver	0,60	0,23	0,18	0,50	0,00
%otoño	0,00	0,15	0,36	0,50	1,00
%invierno	0,40	0,31	0,09	0,00	0,00

Excreción de amonio (E)

Distribución de grupos en clases					
Estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4	clase 5
prim	0	5	0	4	1
ver	4	4	0	0	0
otoño	3	5	2	0	0
invierno	3	3	0	0	0
total	10	17	2	4	1
%prim	0,00	0,29	0,00	1,00	1,00
%ver	0,40	0,24	0,00	0,00	0,00
%otoño	0,30	0,29	1,00	0,00	0,00
%invierno	0,30	0,18	0,00	0,00	0,00

Cociente de amonio (CA)

Distribución de grupos en clases					
Estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4	clase 5
prim	2	4	1	2	0
ver	3	3	0	0	1
otoño	5	4	1	0	0
invierno	1	4	1	0	0
total	11	15	3	2	2
%prim	0,18	0,27	0,33	1,00	0,00
%ver	0,27	0,20	0,00	0,00	1,00
%otoño	0,45	0,27	0,33	0,00	0,00
%invierno	0,09	0,27	0,33	0,00	0,00

Scope For Growth (SFG)

Distribución de grupos en clases				
Estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4
prim	3	5	0	0
ver	1	1	2	0
otoño	1	1	2	3
invierno	0	1	3	2
total	5	8	7	5
%prim	0,60	0,63	0,00	0,00
%ver	0,20	0,13	0,29	0,00
%otoño	0,20	0,13	0,29	0,60
%invierno	0,00	0,13	0,43	0,40

Biomarcadores bioquímicos: Medidas resumen; estadística descriptiva de las actividades enzimáticas de AChE, CAT, GST y contenido de GSH

Acetil colinesterasa (AChE)

estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4	clase 5
prim	2	4	1	2	0
ver	3	3	0	0	1
otoño	5	4	1	0	0
invierno	1	4	1	0	0
total	11	15	3	2	2
% prim	0,18	0,27	0,33	1,00	0,00
% ver	0,27	0,20	0,00	0,00	1,00
% otoño	0,45	0,27	0,33	0,00	0,00
% invierno	0,09	0,27	0,33	0,00	0,00

CATALASA (CAT)

	numero de datos por clase					
CAT frecuencias:	prim	Ver	Oto	inv	Tot	proporcion
clase 1	5	2	4	9	20	0,364
clase 2	3	4	8	5	20	0,364
clase 3	3	1	3	1	8	0,145
clase 4	2	0	2	0	4	0,073
clase 5	1	0	2	0	3	0,055

GST

Estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4	clase 5
prim	4	6	2	2	0
ver	3	3	1	0	0
otoño	2	4	5	4	3
invierno	10	5	0	0	0
total	19	18	8	6	3
% prim	0,21	0,33	0,25	0,33	0,00
% ver	0,16	0,17	0,13	0,00	0,00
% otoño	0,11	0,22	0,63	0,67	1,00
% invierno	0,53	0,28	0,00	0,00	0,00

GSH

Estación	clase 1	clase2	clase 3	clase 4	clase 5
prim	0	0	1	2	3
ver	1	4	1	0	0
otoño	1	8	3	4	2
invierno	9	5	0	1	0
total	11	17	5	7	5
% prim	0,00	0,00	0,20	0,29	0,60
% ver	0,09	0,24	0,20	0,00	0,00
% otoño	0,09	0,47	0,60	0,57	0,40
% invierno	0,82	0,29	0,00	0,14	0,00

ANOVAs:

Análisis de la varianza peso

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
peso	74	0,15	0,11	35,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19250,05	3	6416,68	3,89	0,0126
ENSAYO	19250,05	3	6416,68	3,89	0,0126
Error	112224,43	68	1650,36		
Total	131474,48	71			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ENSAYO	Media
T12 INV	135,88
T12 OTO	125,98
T12 PRIM	101,12
T12 VER	96,97

Matriz de diferencias entre medias

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=35,87513

	1	2	3	4
1				*
2	nd			
3	nd	nd		
4	nd	nd	nd	

Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido

Análisis de la varianza talla

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
talla	74	0,18	0,14	13,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	163,70	3	54,57	4,98	0,0035
ENSAYO	163,70	3	54,57	4,98	0,0035
Error	767,33	70	10,96		
Total	931,03	73			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ENSAYO	Media	E.E.	n
T12 INV	27,31	0,85	15
T12 OTO	25,75	0,71	22
T12 PRIM	24,55	0,76	19
T12 VER	23,05	0,78	18

Matriz de diferencias entre medias

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,89202

	1	2	3	4
1				*
2	nd			
3	nd	nd		
4	nd	nd	nd	

Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido

Análisis de la varianza FC Total

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
FC total	74	0,09	0,05	18,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,11	3	0,04	2,27	0,0882
ENSAYO	0,11	3	0,04	2,27	0,0882
Error	1,18	70	0,02		
Total	1,30	73			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ENSAYO	Media	E.E.	n
T12 INV	0,65	0,03	15
T12 OTO	0,72	0,03	22
T12 PRIM	0,64	0,03	19
T12 VER	0,73	0,05	18

Matriz de diferencias entre medias

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11352

	1	2	3	4
1				
2	nd			
3	nd	nd		
4	nd	nd	nd	

Análisis de la varianza HSI

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HSI	74	0,05	4,4E-03	54,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,97	3	0,66	1,11	0,3515
ENSAYO	1,97	3	0,66	1,11	0,3515
Error	41,47	70	0,59		
Total	43,44	73			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ENSAYO	Media	E.E.	n
T12 INV	1,22	0,14	15
T12 OTO	1,69	0,14	22
T12 PRIM	1,59	0,2	19
T12 VER	1,55	0,2	18

Matriz de diferencias entre medias

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,67228

	1	2	3	4
1				

2	nd		
3	nd	nd	
4	nd	nd	nd

Análisis de la varianza IGS

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
IGS	45	0,06	0,02	70,56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,82	2	0,41	1,38	0,2625
ENSAYO	0,82	2	0,41	1,38	0,2625
Error	12,48	42	0,30		
Total	13,30	44			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ENSAYO	Media	E.E.	n
T12 INV	0,75	0,09	14
T12 OTO	0,66	0,06	20
T12 VER	1,00	0,3	11

Matriz de diferencias entre medias

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,49834

	1	2	3
1			
2	nd		
3	nd	nd	

Análisis de la varianza Ing J/g PH/día

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ing J/g PH/día	198	0,32	0,31	18,17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	179846,58	3	59948,86	29,83	<0,0001
ENSAYO	179846,58	3	59948,86	29,83	<0,0001
Error	389815,36	194	2009,36		
Total	569661,94	197			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ENSAYO	Media	E.E.	n
T12 INV	233,37	7,79	33
T12 OTO	280,64	6,00	61
T12 PRIM	260,76	7,53	48
T12 VER	205,68	5,14	56

Matriz de diferencias entre medias

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=23,83468

	1	2	3	4
1		*	*	*

2	nd		*
3	nd	nd	*
4	nd	nd	nd

Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido

heces J/g/PH/día

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
heces J/g/PH/día	198	0,15	0,14	49,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18383,17	3	6127,72	11,74	<0,0001
ENSAYO	18383,17	3	6127,72	11,74	<0,0001
Error	101248,15	194	521,90		
Total	119631,32	197			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ENSAYO	Media	E.E.	n
T12 INV	39,38	3,05	33
T12 OTO	40,10	2,27	61
T12 PRIM	63,24	4,91	48
T12 VER	42,82	2,43	56

Matriz de diferencias entre medias

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=12,14712

	1	2	3	4
1			*	
2	nd		*	
3	nd	nd		*
4	nd	nd	nd	

Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido

asim/J/g ph/día

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
asim/J/g ph/día	198	0,28	0,26	24,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	178952,12	3	59650,71	24,56	<0,0001
ENSAYO	178952,12	3	59650,71	24,56	<0,0001
Error	471089,19	194	2428,29		
Total	650041,31	197			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ENSAYO	Media	E.E.	n
T12 INV	194,00	7,40	33
T12 OTO	240,54	6,48	61
T12 PRIM	197,51	8,47	48
T12 VER	162,86	5,64	56

Matriz de diferencias entre medias**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=26,20181**

	1	2	3	4
1		*		*
2	nd		*	*
3	nd	nd		*
4	nd	nd	nd	

*Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido***Análisis de la varianza TME**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
tme	35	0,34	0,28	34,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22694,47	3	7564,82	5,38	0,0043
ensayo	22694,47	3	7564,82	5,38	0,0043
Error	43615,75	31	1406,96		
Total	66310,22	34			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ensayo	Media	E.E.	n
T12 INV	83,86	13,26	8
T12 OTO	147,79	12,50	9
T12 PRIM	115,55	12,50	9
T12 VER	88,66	12,50	9

Matriz de diferencias entre medias**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=48,73466**

	1	2	3	4
1		*		
2	nd			*
3	nd	nd		
4	nd	nd	nd	

*Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido***Análisis de la varianza EEO**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
EEO	44	0,48	0,44	45,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	313,53	3	104,51	12,34	<0,0001
ensayo	313,53	3	104,51	12,34	<0,0001
Error	338,73	40	8,47		
Total	652,26	43			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ensayo	Media	E.E.	n
T12 INV	9,93	0,92	10
T12 OTO	7,50	0,88	11
T12 PRIM	2,58	0,84	12

T12 VER 6,18 0,88 11

Matriz de diferencias entre medias

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,33288

	1	2	3	4
1			*	*
2	nd		*	
3	nd	nd		*
4	nd	nd	nd	

Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido

Análisis de la varianza E

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
EXC	34	0,39	0,33	46,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1524,89	3	508,30	6,51	0,0016
ensayo	1524,89	3	508,30	6,51	0,0016
Error	2342,59	30	78,09		
Total	3867,48	33			

Medias ajustadas,error estándar y número de observaciones

ensayo	Media	E.E.	n
T12 INV	14,22	3,61	6
T12 OTO	16,01	2,79	10
T12 PRIM	29,11	2,79	10
T12 VER	13,12	3,12	8

Matriz de diferencias entre medias

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11,91338

	1	2	3	4
1			*	
2	nd		*	
3	nd	nd		*
4	nd	nd	nd	

Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido

Análisis de la varianza CA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CA	33	0,17	0,08	69,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,12	3	0,04	1,99	0,1375
ensayo	0,12	3	0,04	1,99	0,1375
Error	0,57	29	0,02		
Total	0,69	32			

Medias ajustadas,error estándar y número de observaciones

ensayo	Media	E.E.	n
T12 INV	0,19	0,06	6
T12 OTO	0,13	0,04	10
T12 PRIM	0,28	0,04	10
T12 VER	0,21	0,05	7

Matriz de diferencias entre medias**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,19334**

	1	2	3	4
1				
2	nd			
3	nd	nd		
4	nd	nd	nd	

*Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido***Análisis de la varianza SFG**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SFG	25	0,43	0,35	33,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10647,71	3	3549,24	5,24	0,0074
ensayo	10647,71	3	3549,24	5,24	0,0074
Error	14232,49	21	677,74		
Total	24880,20	24			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ensayo	Media	E.E.	n
T12 INV	100,36	10,63	6
T12 OTO	93,66	9,84	7
T12 PRIM	51,10	9,20	8
T12 VER	72,04	13,02	4

Matriz de diferencias entre medias**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=42,45201**

	1	2	3	4
1			*	
2	nd		*	
3	nd	nd		
4	nd	nd	nd	

*Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido***Análisis de la varianza AChE**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AChE c (nmol/min.gr prot)	53	0,67	0,66	21,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	306064,10	2	153032,05	50,81	<0,0001
Tratamiento	306064,10	2	153032,05	50,81	<0,0001

Error	150606,60	50	3012,13
Total	456670,71	52	

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Tratamiento	Media	E.E.	n
MHWt12 oto	222,17	13,31	17
MHWt12 prim	196,59	12,59	19
MHWt12 ver	369,90	13,31	17
T12 MHW inv	nd	nd	0

Matriz de diferencias entre medias**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=44,66468**

	1	2	3	4
1			*	*
2	nd		*	*
3	nd	nd		*
4	nd	nd	nd	

*Los * indican diferencias significativas para el nivel elegido***Analysis of variance CAT**

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
CAT (AE (mmoles H2O2 hydr..	53	0,15	0,10	49,52

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	95424,22	3	31808,07	2,99	0,0398
Tratamiento	95424,22	3	31808,07	2,99	0,0398
Error	521155,47	49	10635,83		
Total	616579,69	52			

Adjusted means, standard errors and sample size

Tratamiento	Mean	S.E.	n
MHWt12 oto	254,36	23,66	19
MHWt12 prim	216,43	27,56	14
MHWt12 ver	186,55	46,12	5
T12 MHW inv	149,52	26,63	15

Matrix of mean differences**Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=121,22645**

	1	2	3	4
1				
2	nd			
3	nd	nd		
4	nd	nd	nd	

*The asterisks show significant differences at the selected alpha-level***Analysis of variance GST (U/ mg Pr)**

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
GSTh (U/ mg Pr)	52	0,39	0,35	43,71

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	0,46	3	0,15	10,31	<0,0001
Tratamiento	0,46	3	0,15	10,31	<0,0001
Error	0,71	48	0,01		
Total	1,17	51			

Adjusted means, standard errors nad sample size

Tratamiento	Mean	S.E.	n
MHWt12 oto	0,39	0,03	18
MHWt12 prim	0,28	0,03	14
MHWt12 ver	0,27	0,05	5
T12 MHW inv	0,15	0,03	15

Matrix of mean differences

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,14402

	1	2	3	4
1				*
2	nd			
3	nd	nd		
4	nd	nd	nd	

The asterisks show significant differences at the selected alpha-level

Analysis of variance GSH

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
GSH (µmol/g tejido)	45	0,57	0,53	39,47

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	2945,67	3	981,89	17,87	<0,0001
Tratamiento	2945,67	3	981,89	17,87	<0,0001
Error	2252,44	41	54,94		
Total	5198,12	44			

Adjusted means, standard errors nad sample size

Tratamiento	Mean	S.E.	n
MHWt12 oto	21,73	1,75	18
MHWt12 prim	33,64	2,80	7
MHWt12 ver	11,99	3,31	5
T12 MHW inv	10,56	1,91	15

Matrix of mean differences

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=9,57045

	1	2	3	4
1		*	*	*
2	nd		*	*
3	nd	nd		
4	nd	nd	nd	

The asterisks show significant differences at the selected alpha-level.

ANEXO CAPÍTULO 6

Cadmio como control positivo:

Parámetros estadísticos descriptivos básicos para Talla, Peso corporal, Factor de Condición (FC), índice hepato-somático (IHS), índice Gónado-somático (IGS) y peso ovárico

Estación	Tratamiento	Parámetro	Media	D.E.	E.E.	CV
Primavera	MHW (19)	peso (mg)	101,12	47,1	10,81	46,58
		talla (mm)	24,55	4,3	0,99	17,51
		FC total	0,64	0,13	0,03	20,32
		HSI total	1,59	0,87	0,2	54,98
	Cd (9)	peso (mg)	102,39	46,33	15,44	45,25
		talla (mm)	26,19	3,83	1,28	14,62
		FC total	0,54 *	0,1	0,03	17,81
		HSI total	1,73	0,38	0,13	21,69
Verano	MHW (18)	peso (mg)	96,97	47,19	11,12	48,67
		talla (mm)	23,05	3,91	0,92	16,96
		FC total	0,73	0,19	0,05	26,14
		HSI total	1,55	0,84	0,2	54,05
	Cd (10)	peso (mg)	75,38	34,25	10,83	45,44
		talla (mm)	21,49	3,11	0,98	14,47
		FC total	0,72	0,09	0,03	12,46
		HSI total	1,15	0,25	0,08	21,37
Otoño	MHW (22)	peso (mg)	125,98	33,52	7,15	26,61
		talla (mm)	25,75	2,29	0,49	8,9
		FC total	0,73	0,09	0,02	12,29
		HSI total	1,69	0,64	0,14	37,87
	Cd (10)	peso (mg)	102,84	22,03	6,97	21,43
		talla (mm)	25,61	1,92	0,61	7,5
		FC total	0,61*	0,08	0,03	13,03
		HSI total	0,76*	0,29	0,09	38,33
Invierno	MHW (15)	peso (mg)	135,88	33,38	8,62	24,56
		talla (mm)	27,31	2,15	0,56	7,88
		FC total	0,66	0,1	0,03	14,98
		HSI total	1,22	0,55	0,14	44,7
	Cd (10)	peso (mg)	119,6	12,64	4	10,57
		talla (mm)	27,98	1,72	0,54	6,14
		FC total	0,55*	0,07	0,02	13,16
		HSI total	0,96	0,34	0,11	35,01

estación	Tratamiento	Variable	Media	D.E.	E.E.	CV
Verano	MHW (11)	IGS	1	0,99	0,3	99,04
		ovarios (mg)	1,23	1,55	0,47	125,49
	Cd (7)	IGS	0,63	0,28	0,1	43,69
		ovarios (mg)	0,6	0,43	0,16	71,43
Otoño	MHW (20)	IGS	0,66	0,25	0,06	38,15
		ovarios (mg)	0,88	0,47	0,11	54,05
	Cd (7)	IGS	0,55	0,14	0,05	24,79
		ovarios (mg)	0,61	0,21	0,08	35,07
Invierno	MHW (14)	IGS	0,75	0,34	0,09	45,08
		ovarios (mg)	1,04	0,39	0,1	37,35
	Cd (9)	IGS	0,37*	0,12	0,04	32,04
		ovarios (mg)	0,44*	0,15	0,05	34,33

Parámetros estadísticos descriptivos básicos para ingesta, heces, asimilación, EEO, TME, E, CA Y SFG de adultos de *C. decemmaculatus* correspondientes a cada ensayo estacional

Estación	Tratamiento	Variable (J/g PH/día)	Media	D.E.	E.E.	CV
Primavera	MHW (48)	Ingesta	260,76	52,18	7,53	20,01
		Heces	63,24	34,03	4,91	53,81
		Asimilación	197,51	58,65	8,47	29,69
	Cd (19)	Ingesta	186,82*	45,07	10,34	24,13
		Heces	39,02*	26,96	6,19	69,09
		Asimilación	147,79*	54,11	12,41	36,62
Verano	MHW (56)	Ingesta	205,68	38,49	5,14	18,71
		Heces	42,82	18,18	2,43	42,45
		Asimilación	162,86	42,19	5,64	25,91
	Cd (28)	Ingesta	140,25*	47,70	9,01	34,01
		Heces	35,92	14,61	2,76	40,68
		Asimilación	104,33*	54,67	10,33	52,40
Otoño	MHW (61)	Ingesta	280,64	46,85	6,00	16,70
		Heces	40,1	17,69	2,27	44,13
		Asimilación	240,54	50,60	6,48	21,04
	Cd (61)	Ingesta	167,87*	45,88	8,67	27,33
		Heces	22,8*	12,97	2,45	56,87
		Asimilación	145,08*	50,06	9,46	34,51
Invierno	MHW (33)	Ingesta	233,37	38,98	6,79	16,70
		Heces	39,38	17,54	3,05	44,55
		Asimilación	194	42,52	7,40	21,92
	Cd (19)	Ingesta	168,37*	34,99	8,03	20,78
		Heces	18,88*	12,24	2,81	64,80
		Asimilación	149,49*	31,05	7,12	20,77

Estación	Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	E.E.	CV
Primavera	MHW	TME (J/g PH/día)	9	115,55	30,27	10,09	26,20
		EEO (%)	12	2,58	1,24	0,36	48,15
		E (J/g PH/día)	10	29,11	11,78	3,73	40,47
		CA	10	0,28	0,17	0,06	62,69
		SFG (J/g PH/día)	8	51,10	17,86	6,32	34,96
	Cd	TME (J/g PH/día)	7	127,55	61,82	23,36	48,46
		EEO (%)	7	3,72	2,87	1,08	77,01
		E (J/g PH/día)	7	15,00	6,28	2,37	41,87
		CA	7	0,15	0,11	0,04	69,51
		SFG (J/g PH/día)	7	-18,74*	62,61	-23,66	334,02
Verano	MHW	TME (J/g PH/día)	9	88,66	44,81	14,94	50,54
		EEO (%)	11	6,18	4,32	1,30	69,91
		E (J/g PH/día)	8	13,12	6,30	2,23	48,06
		CA	7	0,21	0,18	0,07	82,82
		SFG (J/g PH/día)	4	72,04	36,2	18,10	50,25
	Cd	TME (J/g PH/día)	6	117,12	83,43	34,06	71,23
		EEO (%)	6	7,62	4,38	1,79	57,53
		E (J/g PH/día)	4	24,47*	3,01	1,50	12,30
		CA	4	0,64	0,80	0,40	125,44
		SFG (J/g PH/día)	4	-29,57*	49,87	-24,94	168,68
Otoño	MHW	TME (J/g PH/día)	9	147,79	45,85	15,28	31,02
		EEO (%)	11	7,50	1,55	0,47	20,61
		E (J/g PH/día)	10	16,01	7,98	2,52	49,88
		CA	10	0,13	0,09	0,03	71,79
		SFG (J/g PH/día)	7	93,66	26,43	9,99	28,22
	Cd	TME (J/g PH/día)	6	392,9*	191,19	78,05	48,66
		EEO (%)	6	9,06	2,79	1,14	30,79
		E (J/g PH/día)	6	53,66*	25,92	10,58	48,31
		CA	6	0,18	0,14	0,06	74,92
		SFG (J/g PH/día)	6	-301,48*	194,74	-79,50	64,59
Invierno	MHW	TME (J/g PH/día)	8	83,86	22,06	7,80	26,30
		EEO (%)	10	9,93	3,51	1,11	35,34
		E (J/g PH/día)	6	14,22	6,95	2,84	48,85
		CA	4	0,14	0,10	0,05	69,60
		SFG (J/g PH/día)	6	100,36	27,84	11,37	27,74
	Cd	TME (J/g PH/día)	4	204,25*	83,45	41,72	40,85
		EEO (%)	4	10,76	3,34	1,67	31,05
		E (J/g PH/día)	4	23,44	18,26	9,13	77,88
		CA	6	0,19	0,08	0,03	44,26
		SFG (J/g PH/día)	4	-78,21*	84,57	-42,28	108,14

Parámetros estadísticos descriptivos básicos para AChE, CAT, GST y contenido de GSH de

Estación	Tratamiento	Variable	Media	D.E.	E.E.	CV
Primavera	MHW	CAT (14)	216,43	123,90	33,11	57,24
		GSH (7)	33,64	5,31	2,01	15,79
		GST (14)	0,28	0,12	0,03	44,85
		AChE (19)	196,59	57,47	13,18	29,23
	Cd	CAT (9)	130,47	52,20	17,40	40,01
		GSH (9)	33,44	15,71	5,24	46,97
		GST (9)	0,24	0,11	0,04	45,78
		AChE (5)	172,28	32,16	14,38	18,67
Verano	MHW	CAT (7)	186,55	54,31	20,53	29,11
		GSH (7)	11,98	3,47	1,31	28,93
		GST (7)	0,27	0,06	0,02	23,33
		AChE (17)	369,90	56,19	13,63	15,19
	Cd	CAT (10)	289,23*	114,29	36,14	39,52
		GSH (10)	16,27*	4,30	1,36	26,40
		GST (9)	0,39	0,17	0,06	43,70
		AChE (6)	157,18*	12,75	5,20	8,11
Otoño	MHW	CAT (19)	254,36	123,26	28,28	48,46
		GSH (18)	21,73	9,40	2,21	43,25
		GST (18)	0,39	0,16	0,04	40,32
		AChE (17)	222,17	50,40	12,22	22,69
	Cd	CAT (10)	320,98	135,53	42,86	42,22
		GSH (10)	2,90*	1,12	0,35	38,63
		GST (10)	0,57	0,28	0,09	48,96
		AChE (7)	264,01*	49,36	18,65	18,70
Invierno	MHW	CAT (15)	149,52	46,64	12,04	31,19
		GSH (15)	10,56	6,04	1,56	57,15
		GST (15)	0,15	0,07	0,02	46,92
		CAT (10)	461,55*	218,84	69,20	47,41
	Cd	GSH (10)	21,26*	7,14	2,26	33,57
		GST (10)	0,44*	0,13	0,04	28,71

Pruebas de Kruskal Wallis

Prueba de Kruskal Wallis								
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Invierno	peso	Cd	10	119,6	12,64	118,77	0,09	0,7624
Invierno	peso	MHW	10	121,18	27,49	122,2		
Otoño	peso	Cd	10	102,84	22,03	99,23	0	>0,9999
Otoño	peso	MHW	10	105,49	29,3	106,15		
Primavera	peso	Cd	9	102,39	46,33	109,6	7,26	0,0592
Primavera	peso	MHW	8	141,63	23,75	147,08		
Verano	peso	Cd	10	75,38	34,25	61,49	0,97	0,3258
Verano	peso	MHW	10	58,22	23,73	66,38		

Prueba de Kruskal Wallis									
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Invierno	talla	Cd	10	27,98	1,72	28,17	1	1,46	0,2265
Invierno	talla	MHW	10	26,73	2	26,86			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Otoño	talla	Cd	10	25,61	1,92	25,57	1	2,77	0,0958
Otoño	talla	MHW	10	24,35	1,98	23,73			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Primavera	talla	Cd	9	26,19	3,83	24,58	1	3,17	0,2877
Primavera	talla	MHW	8	27,62	3,05	27,07			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Verano	talla	Cd	10	21,49	3,11	20,86	1	1,29	0,2568
Verano	talla	MHW	10	19,79	2	20,53			

Prueba de Kruskal Wallis									
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Invierno	FC total	Cd	10	0,55	0,07	0,59	1	2,64	0,1019
Invierno	FC total	MHW	10	0,63	0,09	0,64			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Otoño	FC total	Cd	10	0,61	0,08	0,63	1	6,61	0,0101
Otoño	FC total	MHW	10	0,72	0,11	0,7			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Primavera	FC total	Cd	9	0,54	0,1	0,54	1	4,9	0,0339
Primavera	FC total	MHW	8	0,69	0,17	0,67			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Verano	FC total	Cd	10	0,72	0,09	0,71	1	0,17	0,6772
Verano	FC total	MHW	10	0,71	0,13	0,72			

Prueba de Kruskal Wallis									
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Invierno	HSI total	Cd	10	0,96	0,34	0,93	1	0,17	0,6775
Invierno	HSI total	MHW	10	1,01	0,37	1,01			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Otoño	HSI total	Cd	10	0,76	0,29	0,76	1	12,36	0,0004
Otoño	HSI total	MHW	10	1,74	0,58	1,6			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Primavera	HSI total	Cd	9	1,73	0,38	1,85	1	0,75	0,1388
Primavera	HSI total	MHW	8	2,24	0,78	2,37			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Verano	HSI total	Cd	10	1,15	0,25	1,12	1	0,14	0,7052
Verano	HSI total	MHW	10	1,57	0,94	1,53			

Prueba de Kruskal Wallis									
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Invierno	IGS	Cd	9	0,37	0,12	0,42	1	9,28	0,0011
Invierno	IGS	MHW	9	0,78	0,43	0,63			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Otoño	IGS	Cd	7	0,55	0,14	0,53	1	0,05	0,6943
Otoño	IGS	MHW	8	0,6	0,2	0,62			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Verano	IGS	Cd	7	0,63	0,28	0,63	1	0,51	0,4452
Verano	IGS	MHW	6	0,49	0,18	0,46			

Prueba de Kruskal Wallis									
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Invierno	ovarios (mg)	Cd	9	0,44	0,15	0,49	1	8,75	0,0015
Invierno	ovarios (mg)	MHW	9	0,98	0,47	0,93			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Otoño	ovarios (mg)	Cd	7	0,61	0,21	0,62	1	0,01	0,841
Otoño	ovarios (mg)	MHW	8	0,66	0,34	0,51			
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Verano	ovarios (mg)	Cd	7	0,6	0,43	0,67	1	1	0,2931
Verano	ovarios (mg)	MHW	6	0,37	0,13	0,39			

Prueba de Kruskal Wallis								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Primavera	Heces	Cd	19	39,02	26,96	29,19	8,29	0,004
Primavera	Heces	MHW	48	63,24	34,03	57,73		
Trat.	Ranks							
Cd	23,11	A						
MHW	38,31		B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Verano	Heces	Cd	28	35,92	14,61	35,6	2,88	0,0894
Verano	Heces	MHW	56	42,82	18,18	44,16		
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Otoño	Heces	Cd	28	22,8	12,97	18,39	22,76	<0,0001
Otoño	Heces	MHW	61	40,1	17,69	37,63		
Trat.	Ranks							
Cd	25,71	A						
MHW	53,85		B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Invierno	Heces	Cd	19	18,88	12,24	12,99	17	<0,0001
Invierno	Heces	MHW	33	39,38	17,54	37,88		
Trat.	Ranks							
Cd	15,08	A						
MHW	33,08		B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								

Prueba de Kruskal Wallis								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Primavera	Ingesta	Cd	19	186,82	45,07	206,4	21,59	<0,0001
Primavera	Ingesta	MHW	48	260,76	52,18	259,25		
Trat.	Ranks							
Cd	16,42	A						
MHW	40,96		B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Verano	Ingesta	Cd	28	140,25	47,7	127,78	27,24	<0,0001
Verano	Ingesta	MHW	56	205,68	38,49	202,05		
Trat.	Ranks							
Cd	22,86	A						
MHW	52,32		B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Otoño	Ingesta	Cd	28	167,87	45,88	171,15	46,77	<0,0001
Otoño	Ingesta	MHW	61	280,64	46,85	291,72		
Trat.	Ranks							
Cd	17,36	A						
MHW	57,69		B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Invierno	Ingesta	Cd	19	168,37	34,99	162,44	22,48	<0,0001
Invierno	Ingesta	MHW	33	233,37	38,98	226,43		
Trat.	Ranks							
Cd	13,37	A						
MHW	34,06		B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								

Prueba de Kruskal Wallis								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Primavera	Asimilación	Cd	19	147,79	54,11	163,89	8,21	0,0042
Primavera	Asimilación	MHW	48	197,51	58,65	192,02		
Trat.	Ranks							
Cd	23,16	A						
MHW	38,29	B						
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Verano	Asimilación	Cd	28	104,33	54,67	101,73	20,14	<0,0001
Verano	Asimilación	MHW	56	162,86	42,19	158,56		
Trat.	Ranks							
Cd	25,61	A						
MHW	50,95	B						
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Otoño	Asimilación	Cd	28	145,08	50,06	148,87	37,92	<0,0001
Otoño	Asimilación	MHW	61	240,54	50,6	245,13		
Trat.	Ranks							
Cd	20,11	A						
MHW	56,43	B						
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Estacion	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Invierno	Asimilación	Cd	19	149,49	31,05	147,53	12,16	0,0005
Invierno	Asimilación	MHW	33	194	42,52	188,53		
Trat.	Ranks							
Cd	16,84	A						
MHW	32,06	B						
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								

Prueba de Kruskal Wallis		TME						
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Primavera	TME	Cd	7	127,55	61,82	110,69	1,01	0,8371
Primavera	TME	MHW	9	115,55	30,27	110,98		
Verano	TME	Cd	6	117,12	83,43	94,73	0,13	0,607
Verano	TME	MHW	9	88,66	44,81	75,9		
Otoño	TME	Cd	6	392,9	191,19	403,56	10,13	0,0076
Otoño	TME	MHW	9	147,79	45,85	134,67		
Invierno	TME	Cd	4	204,25	83,45	213,53	1,85	0,0162
Invierno	TME	MHW	8	83,86	22,06	80,05		
Trat.	Ranks							
Cd		3,5	A					
MHW		11	B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Trat.	Ranks							
Cd		4,5	A					
MHW		7,5	A					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Prueba de Kruskal Wallis		EEO						
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Primavera	EEO	Cd	7	3,72	2,87	2,49	0,58	0,4197
Primavera	EEO	MHW	12	2,58	1,24	1,96		
Verano	EEO	Cd	6	7,62	4,38	7,68	0,49	0,4623
Verano	EEO	MHW	11	6,18	4,32	4,92		
Otoño	EEO	Cd	6	9,06	2,79	9,02	5,34	0,1215
Otoño	EEO	MHW	11	7,5	1,55	7,14		
Invierno	EEO	Cd	4	10,76	3,34	12,02	2,42	0,8392
Invierno	EEO	MHW	10	9,93	3,51	8,45		

Prueba de Kruskal Wallis		EXC							
estación	Variable	Tratamiento	N	Media	D.E.	Mediana	H	p	
Primavera	EXC	Cd	7	15	6,28	14,42	0,01	0,0553	
Primavera	EXC	MHW	10	29,11	11,78	26,82			
Verano	EXC	Cd	4	24,47	3,01	24,47	0,26	0,0162	
Verano	EXC	MHW	8	13,12	6,3	13,65			
Otoño	EXC	Cd	6	53,66	25,92	55,81	1,18	0,0007	
Otoño	EXC	MHW	10	16,01	7,98	17,14			
Invierno	EXC	Cd	4	23,44	18,26	18,22	1,14	0,4762	
Invierno	EXC	MHW	6	14,22	6,95	15,41			
Trat.	Ranks								
Cd	5,75 A								
MHW	6,88 A								
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)									
Cd	6,83 A								
MHW	9,5 A								
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)									

Prueba de Kruskal Wallis		CA							
estación	Variable	Tratamiento	N	Media	D.E.	Mediana	H	p	
Primavera	CA	Cd	7	0,15	0,11	0,14	0,15	0,1029	
Primavera	CA	MHW	10	0,28	0,17	0,19			
Verano	CA	Cd	4	0,64	0,8	0,35	1,51	0,3818	
Verano	CA	MHW	7	0,21	0,18	0,19			
Otoño	CA	Cd	6	0,18	0,14	0,14	2,83	0,4438	
Otoño	CA	MHW	10	0,13	0,09	0,14			
Invierno	CA	Cd	4	0,14	0,1	0,13	0,05	0,4762	
Invierno	CA	MHW	6	0,19	0,08	0,18			

Prueba de Kruskal Wallis		SFG							
estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Mediana	H	p	
Invierno	SFG	Cd	4	-78,21	84,57	-100,31	4,55	0,0095	
Invierno	SFG	MHW	6	100,36	27,84	106,61			
Otoño	SFG	Cd	6	-301,48	194,74	-321,62	9	0,0012	
Otoño	SFG	MHW	7	93,66	26,43	97,55			
Primavera	SFG	Cd	7	-18,74	62,61	-0,29	5,36	0,0009	
Primavera	SFG	MHW	8	51,1	17,86	54,03			
Verano	SFG	Cd	4	-29,57	49,87	-17,48	5,33	0,0286	
Verano	SFG	MHW	4	72,04	36,2	78,95			
Trat.	Ranks			Medias con una letra común no son significativamente dife					
MHW	3,83 A			Trat.	Ranks				
Cd	8		B	MHW	5,5 A				
Trat.	Ranks			Cd	10,86		B		
MHW	4 A			Trat.	Ranks				
Cd	10,5		B	MHW	2,5 A				
				Cd	6,5		B		

Prueba de Kruskal Wallis		CATH (AE (mmoles H2O2 hidr..						
Estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Primavera	CAT	Cd	9	130,47	52,2	117,59	2,68	0,1015
		MHW	14	216,43	123,9	170,39		
Verano		Cd	10	289,23	114,29	265,37	3,81	0,0214
		MHW	7	186,55	54,31	172,97		
Otoño		Cd	10	320,98	135,53	320,98	2,43	0,1187
		MHW	19	254,36	123,26	217,63		
Invierno		Cd	10	461,55	218,84	412,98	14,65	0,0001
		MHW	15	149,52	46,64	129,89		
Trat. Verano	Ranks			Trat. Inv	Ranks			
Cd	7	A		MHW	8,4	A		
MHW	11,86	A		Cd	19,9	B		
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Prueba de Kruskal Wallis		GSTh (U/ mg Pr)						
Estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Primavera	GST	Cd	9	0,24	0,11	0,24	0,36	0,549
		MHW	14	0,28	0,12	0,25		
Verano		Cd	9	0,39	0,17	0,41	2,87	0,1827
		MHW	7	0,27	0,06	0,27		
Otoño		Cd	10	0,57	0,28	0,53	2,9	0,0885
		MHW	18	0,39	0,16	0,4		
Invierno		Cd	10	0,44	0,13	0,47	16,4	0,0001
		MHW	15	0,15	0,07	0,14		
Trat. Inv	Ranks							
MHW	8,13	A						
Cd	20,3		B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								

Prueba de Kruskal Wallis		GSHh ($\mu\text{mol/g}$ tejido)						
Estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Primavera	GSH	Cd	9	33,44	15,71	31,19	2,04	0,351
		MHW	7	33,64	5,31	34,45		
Verano		Cd	10	16,27	4,3	14,99	3,62	0,0269
		MHW	7	11,98	3,47	11,98		
Otoño		Cd	10	2,9	1,12	2,58	18,62	<0,0001
		MHW	18	21,73	9,4	17,91		
Invierno		Cd	10	21,26	7,14	20,85	11,83	0,0006
		MHW	15	10,56	6,04	9,75		
Trat. Verano	Ranks	A		Trat. Otoño	Ranks			
	Cd	7,05			Cd	5,5	A	
	MHW	11,79			MHW	19,5		B
Trat. Inv	Ranks							
	MHW	8,87	A					
	Cd	19,2		B				
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Prueba de Kruskal Wallis		AChE c (nmol/min.gr prot)						
Estación	Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Primavera		Cd	5	172,28	32,16	167,11	0,92	0,3373
		MHW	19	196,59	57,47	175,86		
Verano	AChE	Cd	6	157,18	12,75	159,63	12,75	0,0004
		MHW	17	369,9	56,19	359,77		
Otoño		Cd	7	264,01	49,36	243,68	4	0,0454
		MHW	17	222,17	50,4	225,4		
Trat. Verano	Ranks			Trat. Otoño	Ranks			
	Cd	3,5	A		MHW	10,65	A	
	MHW	15		B	Cd	17		B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								

ANEXO CAPÍTULO 7

Evaluación del efecto de la exposición a aguas receptoras del río Reconquista

Parámetros estadísticos descriptivos básicos para Talla, Peso corporal, Factor de Condición (FC), índice hepato-somático (IHS), índice Gónado-somático (IGS) y peso ovárico

Estación	Tratamiento	Parámetro	n	media	D.E	E.E	C.V
Primavera	MHW	peso	19	101,12	47,1	10,81	46,58
		talla	19	24,55	4,3	0,99	17,51
		FC total	19	0,64	0,13	0,03	20,32
		hígado (mg)	19	2,26	1,09	0,25	47,93
		HSI total	19	1,59	0,87	0,2	54,98
	RR	peso	10	62,39*	25,65	8,11	41,11
		talla	10	22,01	3,16	1	14,38
		FC total	10	0,57	0,08	0,03	14,55
		hígado (mg)	9	1,37	0,61	0,2	44,48
		HSI total	9	2,24	0,98	0,33	43,53
Verano	MHW	peso	18	96,97	47,19	11,12	48,67
		talla	18	23,05	3,91	0,92	16,96
		FC total	18	0,73	0,19	0,05	26,14
		hígado (mg)	18	1,68	1,39	0,33	83,02
		HSI total	18	1,55	0,84	0,2	54,05
	RR	peso	10	175,82*	68,45	21,64	38,93
		talla	10	27,83*	2,07	0,65	7,43
		FC total	10	0,8	0,23	0,07	28,11
		hígado (mg)	7	2,31	1,83	0,69	79,32
		HSI total	7	1,5	1,08	0,41	71,74
Otoño	MHW	peso	22	125,98	33,52	7,15	26,61
		talla	22	25,75	2,29	0,49	8,9
		FC total	22	0,73	0,09	0,02	12,29
		hígado (mg)	22	2,08	0,81	0,17	39,27
		HSI total	22	1,69	0,64	0,14	37,87
	RR	peso	15	127,67	40,07	10,35	31,39
		talla	15	25,53	2,84	0,73	11,11
		FC total	15	0,75	0,1	0,03	13,55
		hígado (mg)	11	1,54	0,87	0,26	56,56
		HSI total	11	1,27	0,58	0,18	45,92
Invierno	MHW	peso	15	135,88	33,38	8,62	24,56
		talla	15	27,31	2,15	0,56	7,88
		FC total	15	0,66	0,1	0,03	14,98
		hígado (mg)	15	1,73	1,12	0,29	64,52
		HSI total	15	1,22	0,55	0,14	44,7
	RR	peso	13	148,15	41,43	11,49	27,97

talla	13	27,25	2,36	0,65	8,66
FC total	13	0,71	0,09	0,03	12,68
hígado (mg)	12	2,63*	1,2	0,35	45,65
HSI total	12	1,72	0,75	0,22	43,35

Parámetros estadísticos descriptivos básicos para peso de ovarios e índice gónado-somático (IGS) d

Estación	Tratamiento	Parámetro	media	D.E	E.E	C.V
Verano	MHW (11)	IGS	1	0,99	0,3	99,04
		ovarios (mg)	1,23	1,55	0,47	125,49
	RR (4)	IGS	0,7	0,32	0,16	45,49
		ovarios (mg)	0,9	0,41	0,2	45,22
Otoño	MHW (20)	IGS	0,66	0,25	0,06	38,15
		ovarios (mg)	0,88	0,47	0,11	54,05
	RR (10)	IGS	0,68	0,17	0,05	24,57
		ovarios (mg)	0,93	0,35	0,11	38,28
Invierno	MHW (14)	IGS	0,75	0,34	0,09	45,08
		ovarios (mg)	1,04	0,39	0,1	37,35
	RR (9)	IGS	2,1*	1,45	0,48	68,94
		ovarios (mg)	3,31*	2,13	0,71	64,44

Estadística descriptiva para cada ensayo correspondiente a Ingesta (I), producción de heces (H) y asimilación del alimento (A) (J/g/PH/día)

Estación	Tratamiento	Parámetro (J/g PH/día)	media	D.E.	E.E	C.V.
Primavera	MHW (48)	Ingesta	260,76	52,18	7,53	20,01
		Heces	63,24	34,03	4,91	53,81
		Asimilación	197,51	58,65	8,47	29,69
	RR (29)	Ingesta	260,08	68,37	12,70	26,29
		Heces	130,93*	64,93	12,06	49,59
		Asimilación	129,15*	62,25	11,56	48,20
Verano	MHW (56)	Ingesta	205,68	38,49	5,14	18,71
		Heces	42,82	18,18	2,43	42,45
		Asimilación	162,86	42,19	5,64	25,91
	RR (29)	Ingesta	184,29*	26,59	4,94	14,43
		Heces	82,91*	23,95	4,45	28,88
		Asimilación	101,38*	23,46	4,36	23,14
Otoño	MHW (61)	Ingesta	280,64	46,85	6,00	16,70
		Heces	40,10	17,69	2,27	44,13
		Asimilación	240,54	50,60	6,48	21,04
	RR (32)	Ingesta	319,78*	18,13	3,21	5,67
		Heces	105,90*	22,24	3,93	21,00
		Asimilación	213,88*	31,02	5,48	14,51
Invierno	MHW (33)	Ingesta	233,37	38,98	6,79	16,70
		Heces	39,38	17,54	3,05	44,55
		Asimilación	194,00	42,52	7,40	21,92

RR (6)	Ingesta	268,95*	32,64	13,32	12,13
	Heces	68,03	42,52	17,36	62,50
	Asimilación	200,92	64,21	26,22	31,96

Valores estadísticos descriptivos básicos para cada ensayo para tasa metabólica específica (TME), Eficiencia de extracción de oxígeno (EEO%), Excreción de amonio (E), cociente de amonio (CA) y Scope For Growth (SFG)

Estación	Tratamiento	Parámetro	n	Media	D.E.	E.E	C.V.
Primavera	MHW	TME (J/g PH/día)	9	115,55	30,27	10,09	26,2
		EEO (%)	12	2,58	1,24	0,36	48,15
		E (J/g PH/día)	10	29,11	11,78	3,73	40,48
		CA	10	0,28	0,17	0,06	62,69
		SFG (J/g PH/día)	8	51,1	17,86	6,32	34,96
	RR	TME (J/g PH/día)	9	68,57*	30,98	10,33	45,18
		EEO (%)	9	1,83	1,32	0,44	72,11
		E (J/g PH/día)	7	52,22*	11,49	4,34	22,01
		CA	7	1,12*	0,65	0,25	58,32
		SFG (J/g PH/día)	7	14*	29,04	10,98	207,35
Verano	MHW	TME (J/g PH/día)	9	88,66	44,81	14,94	50,54
		EEO (%)	11	6,18	4,32	1,3	69,91
		E (J/g PH/día)	8	13,12	6,31	2,23	48,06
		CA	7	0,21	0,18	0,07	82,82
		SFG (J/g PH/día)	4	72,04	36,2	18,1	50,25
	RR	TME (J/g PH/día)	4	40,42	14,04	7,02	34,74
		EEO (%)	4	3,57	0,28	0,14	7,96
		E (J/g PH/día)	4	62,9*	16,94	8,47	26,93
		CA	4	1,06*	0,56	0,28	53,21
		SFG (J/g PH/día)	4	16,85	33,85	16,92	200,93
Otoño	MHW	TME (J/g PH/día)	9	147,79	45,85	15,28	31,02
		EEO (%)	11	7,5	1,55	0,47	20,61
		E (J/g PH/día)	10	16,01	7,98	2,52	49,87
		CA	10	0,13	0,09	0,03	71,79
		SFG (J/g PH/día)	7	93,66	26,43	9,99	28,22
	RR	TME (J/g PH/día)	6	67,61*	23,54	9,61	34,82
		EEO (%)	6	4,71*	1,46	0,6	30,98
		E (J/g PH/día)	6	16,76	4,74	1,93	28,26
		CA	6	0,29*	0,13	0,05	43,28
		SFG (J/g PH/día)	6	129,51	23,8	9,72	18,38
Invierno	MHW	TME (J/g PH/día)	8	83,86	22,06	7,8	26,3
		EEO (%)	10	9,93	3,51	1,11	35,34
		E (J/g PH/día)	6	14,22	6,95	2,84	48,84
		CA	6	0,19	0,08	0,03	44,26
		SFG (J/g PH/día)	6	100,36	27,84	11,37	27,74
	RR	TME (J/g PH/día)	7	111,22*	15,4	5,82	13,85
		EEO (%)	7	11,67	2,77	1,05	23,76
		E (J/g PH/día)	5	18,81	20,6	9,21	109,56
		CA	5	0,16	0,17	0,07	100,99
		SFG (J/g PH/día)	5	68,94	31,95	14,29	46,35

Actividad de CAT (AE:mmoles H₂O₂ hidr/min/mg), GST (U/mg Pr) y contenido de GSH (μmol/g tejido) en hígado y actividad de AChE (nmol/min g Pr) en cerebro

Estación	Tratamiento	Parámetro	Media	D.E.	E.E.	C.V.
Primavera	MHW	CAT (14)	216,43	123,9	33,11	57,24
		GSH (7)	33,64	5,31	2,01	15,79
		GST (14)	0,28	0,12	0,03	44,85
		AChE (19)	196,59	57,47	13,18	29,23
	RR	CAT (10)	228,6	51,36	16,24	22,47
		GSH (10)	37,17	21,42	6,77	57,64
		GST (10)	0,39*	0,08	0,03	21,93
		AChE (10)	282,21*	92,35	29,2	32,72
Verano	MHW	CAT (7)	186,55	54,31	20,53	29,11
		GSH (7)	11,98	3,47	1,31	28,93
		GST (7)	0,27	0,06	0,02	23,33
		AChE (17)	369,9	56,19	13,63	15,19
	RR	CAT (6)	238,57	101,52	41,45	42,56
		GSH (6)	17,08	15,97	6,52	93,52
		GST (7)	0,3	0,13	0,05	43,95
		AChE (7)	126,94*	15,04	5,69	11,85
Otoño	MHW	CAT (19)	254,36	123,26	28,28	48,46
		GSH (18)	21,73	9,4	2,21	43,25
		GST (18)	0,39	0,16	0,04	40,32
		AChE (17)	222,17	50,4	12,22	22,69
	RR	CAT (9)	409,94*	98,03	32,68	23,91
		GSH (9)	34,82	24,58	8,19	70,59
		GST (9)	0,18*	0,04	0,01	24,44
		AChE (5)	266,29*	28,49	12,74	10,7
Invierno	MHW	CAT (15)	149,52	46,64	12,04	31,19
		GSH (15)	10,56	6,04	1,56	57,15
		GST (15)	0,15	0,07	0,02	46,92
	RR	CAT (10)	474,76*	181,02	57,24	38,13
		GSH (10)	16,95*	8,69	2,75	51,28
		GST (10)	0,25*	0,05	0,02	20,77

Pruebas de Kruskal Wallis biomarcadores biométricos:

Kruskal Wallis Test PESO									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	peso	MHW	19	101,12	47,1	99	17,42	4,45	0,0348
Primavera	peso	RR	10	62,39	25,65	52,54	10,4		
Verano	peso	MHW	18	96,97	47,19	92,84	11,17	8,28	0,004
Verano	peso	RR	10	175,82	68,45	150,69	20,5		
Otoño	peso	MHW	22	125,98	33,52	120	18,59	0,08	0,7807
Otoño	peso	RR	15	127,67	40,07	120,91	19,6		
Invierno	peso	MHW	15	135,88	33,38	137,8	12,73	1,49	0,2222
Invierno	peso	RR	13	148,15	41,43	149,75	16,54		
Treat. PRIM	Ranks			Treat. \	Ranks				
RR	10,4	A		MHW	11,17	A			
MHW	17,42	B		RR	20,5	B			
Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)									
Kruskal Wallis Test TALLA									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	talla	MHW	19	24,55	4,3	24,46	16,89	2,73	0,0986
Primavera	talla	RR	10	22,01	3,16	20,97	11,4		
Verano	talla	MHW	18	23,05	3,91	24	11	9,12	0,0025
Verano	talla	RR	10	27,83	2,07	27,95	20,8		
Otoño	talla	MHW	22	25,75	2,29	25,51	19	0	>0,9999
Otoño	talla	RR	15	25,53	2,84	25,66	19		
Invierno	talla	MHW	15	27,31	2,15	27,43	14,4	4,80E-03	0,9449
Invierno	talla	RR	13	27,25	2,36	27,61	14,62		
Treat. VER	Ranks								
MHW	11	A							
RR	20,8	B							
Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)									
Kruskal Wallis Test FC									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	FC total	MHW	19	0,64	0,13	0,61	16,87	2,65	0,1024
Primavera	FC total	RR	10	0,57	0,08	0,58	11,45		
Verano	FC total	MHW	18	0,73	0,19	0,68	13,53	0,7	0,401
Verano	FC total	RR	10	0,8	0,23	0,7	16,25		
Otoño	FC total	MHW	22	0,73	0,09	0,71	17,64	0,86	0,3528
Otoño	FC total	RR	15	0,75	0,1	0,76	21		
Invierno	FC total	MHW	15	0,66	0,1	0,67	12,7	1,55	0,212
Invierno	FC total	RR	13	0,71	0,09	0,71	16,58		

Kruskal Wallis Test PESO HÍGADO									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	hígado (mg)	MHW	19	2,26	1,09	1,68	16,42	3,22	0,0725
Primavera	hígado (mg)	RR	9	1,37	0,61	1,33	10,44		
Verano	hígado (mg)	MHW	18	1,68	1,39	1,57	12,03	1,12	0,2893
Verano	hígado (mg)	RR	7	2,31	1,83	2,16	15,5		
Otoño	hígado (mg)	MHW	22	2,08	0,81	1,81	18,66	1,94	0,1633
Otoño	hígado (mg)	RR	11	1,54	0,87	1,65	13,68		
Invierno	hígado (mg)	MHW	15	1,73	1,12	1,59	10,87	5,26	0,0218
Invierno	hígado (mg)	RR	12	2,63	1,2	2,27	17,92		
Treat.	Ranks								
MHW	10,87	A							
RR	17,92	B							
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									

Kruskal Wallis Test IHS									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	HSI total	MHW	19	1,59	0,87	1,37	12,66	2,96	0,0851
Primavera	HSI total	RR	9	2,24	0,98	2,06	18,39		
Verano	HSI total	MHW	18	1,55	0,84	1,4	13,11	0,01	0,9037
Verano	HSI total	RR	7	1,5	1,08	1,48	12,71		
Otoño	HSI total	MHW	22	1,69	0,64	1,54	18,91	2,57	0,1087
Otoño	HSI total	RR	11	1,27	0,58	1,35	13,18		
Invierno	HSI total	MHW	15	1,22	0,55	1,17	11,43	3,53	0,0602
Invierno	HSI total	RR	12	1,72	0,75	1,65	17,21		

Kruskal Wallis Test IGS									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Verano	IGS	MHW	11	1	0,99	0,77	8,18	0,07	0,8286
Verano	IGS	RR	4	0,7	0,32	0,71	7,5		
Otoño	IGS	MHW	20	0,66	0,25	0,62	14,85	0,33	0,5672
Otoño	IGS	RR	10	0,68	0,17	0,73	16,8		
Invierno	IGS	MHW	14	0,75	0,34	0,7	8,75	8,22	0,0041
Invierno	IGS	RR	9	2,1	1,45	1,89	17,06		
Treat.	Ranks								
MHW	8,75	A							
RR	17,06	B							
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									

Kruskal Wallis Test PESO OVARIOS									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Verano	ovarios (mg)	MHW	11	1,23	1,55	0,57	7,45	0,61	0,4718
Verano	ovarios (mg)	RR	4	0,9	0,41	0,86	9,5		
Otoño	ovarios (mg)	MHW	20	0,88	0,47	0,64	14,55	0,7	0,4031
Otoño	ovarios (mg)	RR	10	0,93	0,35	0,82	17,4		
Invierno	ovarios (mg)	MHW	14	1,04	0,39	0,97	8,89	7,51	0,0061
Invierno	ovarios (mg)	RR	9	3,31	2,13	2,96	16,83		
Treat.	Ranks								
MHW	8,89	A							
RR	16,83	B							
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									

Pruebas de Kruskal Wallis biomarcadores metabólicos:

Kruskal Wallis Test		Ing J/g PH/día								
ENSAYO	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p	
T12 PRIM	Ing J/g PH/dí	MHW	48	260,76	52,18	259,25	40,35	0,47	0,4944	
T12 PRIM	Ing J/g PH/dí	RR	29	260,08	68,37	239,79	36,76			
T12 VER	Ing J/g PH/dí	MHW	56	205,68	38,49	202,05	47,36	5,12	0,0237	
T12 VER	Ing J/g PH/dí	RR	29	184,29	26,59	178,68	34,59			
T12 OTO	Ing J/g PH/dí	MHW	61	280,64	46,85	291,72	38,45	17,79	<0,0001	
T12 OTO	Ing J/g PH/dí	RR	32	319,78	18,13	322,85	63,3			
T12 INV	Ing J/g PH/dí	MHW	33	233,37	38,98	226,43	18,27	4,92	0,0265	
T12 INV	Ing J/g PH/dí	RR	6	268,95	32,64	262,74	29,5			
Treat. VER	Ranks					Treat. INV	Ranks			
RR	34,59 A					MHW	18,27 A			
MHW	47,36		B			RR	29,5		B	
Treat. OTO	Ranks									
MHW	38,45 A									
RR	63,3		B							
Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)										
Kruskal Wallis Test		heces J/g/PH/día								
ENSAYO	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p	
T12 VER	heces J/g/PH	MHW	56	42,82	18,18	44,16	31,11	38,11	<0,0001	
T12 VER	heces J/g/PH	RR	29	82,91	23,95	87,31	65,97			
T12 PRIM	heces J/g/PH	MHW	48	63,24	34,03	57,73	28,79	26,54	<0,0001	
T12 PRIM	heces J/g/PH	RR	29	130,93	64,93	115,2	55,9			
T12 OTO	heces J/g/PH	MHW	61	40,1	17,69	37,63	31,48	58,65	<0,0001	
T12 OTO	heces J/g/PH	RR	32	105,9	22,24	100,8	76,59			
T12 INV	heces J/g/PH	MHW	33	39,38	17,54	37,88	18,76	2,55	0,1105	
T12 INV	heces J/g/PH	RR	6	68,03	42,52	54,83	26,83			
Treat. PRIM	Ranks			Treat. OTO	Ranks					
MHW	28,79 A			MHW	31,48 A					
RR	55,9		B	RR	76,59		B			
Treat. VER	Ranks									
MHW	31,11 A									
RR	65,97		B							
Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)										
Kruskal Wallis Test		asim/J/g ph/día								
ENSAYO	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p	
T12 PRIM	asim/J/g ph/	MHW	48	197,51	58,65	192,02	48,04	20,82	<0,0001	
T12 PRIM	asim/J/g ph/	RR	29	129,15	62,25	119,78	24,03			
T12 VER	asim/J/g ph/	MHW	56	162,86	42,19	158,56	55,05	39,15	<0,0001	
T12 VER	asim/J/g ph/	RR	29	101,38	23,46	103,18	19,72			
T12 OTO	asim/J/g ph/	MHW	61	240,54	50,6	245,13	52,18	6,53	0,0106	
T12 OTO	asim/J/g ph/	RR	32	213,88	31,02	225,4	37,13			
T12 INV	asim/J/g ph/	MHW	33	194	42,52	188,53	19,85	0,04	0,8457	
T12 INV	asim/J/g ph/	RR	6	200,92	64,21	210,3	20,83			
Treat. PRIM	Ranks					Treat. OTO	Ranks			
RR	24,03 A					RR	37,13 A			
MHW	48,04		B			MHW	52,18		B	
Treat. VER	Ranks									
RR	19,72 A									
MHW	55,05		B							
Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)										

Kruskal Wallis Test TME									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	tms	MHW	9	115,55	30,27	110,98	12,78	6,79	0,0078
Primavera	tms	RR	9	68,57	30,98	61,1	6,22		
Verano	tms	MHW	9	88,66	44,81	75,9	8,44	4,02	0,0503
Verano	tms	RR	4	40,42	14,04	41,12	3,75		
Otoño	tms	MHW	9	147,79	45,85	134,67	10,89	9,39	0,0008
Otoño	tms	RR	6	67,61	23,54	58,36	3,67		
Invierno	tms	MHW	8	83,86	22,06	80,05	5,5	5,36	0,0205
Invierno	tms	RR	7	111,22	15,4	111,91	10,86		
Treat. PRIM	Ranks			Treat. OTO	Ranks				
RR	6,22	A		RR	3,67	A			
MHW	12,78		B	MHW	10,89		B		
Treat. INV	Ranks								
MHW	5,5	A							
RR	10,86		B						
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									

Kruskal Wallis Test EEO									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	EEO	MHW	12	2,58	1,24	1,96	12,75	2,23	0,1355
Primavera	EEO	RR	9	1,83	1,32	1,65	8,67		
Verano	EEO	MHW	11	6,18	4,32	4,92	8,64	0,84	0,4117
Verano	EEO	RR	4	3,57	0,28	3,63	6,25		
Otoño	EEO	MHW	11	7,5	1,55	7,14	11,55	7,92	0,0031
Otoño	EEO	RR	6	4,71	1,46	4,54	4,33		
Invierno	EEO	MHW	10	9,93	3,51	8,45	7,6	1,87	0,1932
Invierno	EEO	RR	7	11,67	2,77	11,05	11		
Treat. OTO	Ranks								
RR	4,33	A							
MHW	11,55		B						
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									

Kruskal Wallis Test EXC									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	EXC	MHW	10	29,11	11,78	26,83	6,1	8,01	0,0025
Primavera	EXC	RR	7	52,22	11,49	54,57	13,14		
Verano	EXC	MHW	8	13,12	6,31	13,66	4,5	7,38	0,004
Verano	EXC	RR	4	62,9	16,94	63,5	10,5		
Otoño	EXC	MHW	10	16,01	7,98	17,14	9,1	0,42	0,5622
Otoño	EXC	RR	6	16,76	4,74	15,5	7,5		
Invierno	EXC	MHW	6	14,22	6,95	15,41	6,17	0,03	0,9307
Invierno	EXC	RR	5	18,81	20,6	14,55	5,8		
Treat. PRIM	Ranks				Treat. Ver	Ranks			
MHW	6,1	A			MHW	4,5	A		
RR	13,14	B			RR	10,5	B		
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									

Kruskal Wallis Test CA									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	CA	MHW	10	0,28	0,17	0,19	5,9	9,15	0,001
Primavera	CA	RR	7	1,12	0,65	1,03	13,43		
Verano	CA	MHW	7	0,21	0,18	0,19	4,14	6,04	0,0091
Verano	CA	RR	4	1,06	0,56	1,21	9,25		
Otoño	CA	MHW	10	0,13	0,09	0,14	6,15	6,5	0,0081
Otoño	CA	RR	6	0,29	0,13	0,28	12,42		
Invierno	CA	MHW	6	0,19	0,08	0,18	7,08	1,41	0,2684
Invierno	CA	RR	5	0,16	0,17	0,13	4,7		
Treat. PRIM	Ranks				Treat. OTO	Ranks			
MHW	5,9	A			MHW	6,15	A		
RR	13,43	B			RR	12,42	B		
Treat. VER	Ranks								
MHW	4,14	A							
RR	9,25	B							
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									

Kruskal Wallis Test SFG									
estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	SFG	MHW	8	51,1	17,86	54,03	10,63	5,91	0,014
Primavera	SFG	RR	7	14	29,04	9,53	5		
Verano	SFG	MHW	4	72,04	36,2	78,95	6	3	0,1143
Verano	SFG	RR	4	16,85	33,85	17,42	3		
Otoño	SFG	MHW	7	93,66	26,43	97,55	5	4	0,0513
Otoño	SFG	RR	6	129,51	23,8	135,24	9,33		
Invierno	SFG	MHW	6	100,36	27,84	106,61	7,17	1,63	0,2121
Invierno	SFG	RR	5	68,94	31,95	60,05	4,6		
Treat. PRIM	Ranks								
RR	5	A							
MHW	10,63	B							
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									

Pruebas de Kruskal Wallis biomarcadores bioquímicos:

Kruskal Wallis Test CAT									
Estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	(mmoles H2	MHW	14	216,43	123,9	170,39	11,57	0,58	0,4465
Primavera	(mmoles H2	RR	10	228,6	51,36	223,78	13,8		
Verano	(mmoles H2	MHW	7	186,55	54,31	172,97	5,71	1,65	0,2191
Verano	(mmoles H2	RR	6	238,57	101,52	214	8,5		
Otoño	(mmoles H2	MHW	19	254,36	123,26	217,63	11,47	8	0,0047
Otoño	(mmoles H2	RR	9	409,94	98,03	377,01	20,89		
Invierno	(mmoles H2	MHW	15	149,52	46,64	129,89	8,73	12,6	0,0004
Invierno	(mmoles H2	RR	10	474,76	181,02	474,88	19,4		
Treat. INV	Ranks				Treat. OTO	Ranks			
MHW	8,73	A			MHW	11,47	A		
RR	19,4		B		RR	20,89		B	

Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)

Kruskal Wallis Test GSH									
Estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	h ($\mu\text{mol/g tej}$)	MHW	7	33,64	5,31	34,45	8,86	0,01	0,9623
Primavera	h ($\mu\text{mol/g tej}$)	RR	10	37,17	21,42	35,38	9,1		
Verano	h ($\mu\text{mol/g tej}$)	MHW	7	11,98	3,47	11,98	7,14	0,02	0,9161
Verano	h ($\mu\text{mol/g tej}$)	RR	6	17,08	15,97	12,24	6,83		
Otoño	h ($\mu\text{mol/g tej}$)	MHW	18	21,73	9,4	17,91	12,44	2,07	0,1498
Otoño	h ($\mu\text{mol/g tej}$)	RR	9	34,82	24,58	25,14	17,11		
Invierno	h ($\mu\text{mol/g tej}$)	MHW	15	10,56	6,04	9,75	10,4	4,68	0,0305
Invierno	h ($\mu\text{mol/g tej}$)	RR	10	16,95	8,69	15,98	16,9		
Treat.	Ranks								
MHW	10,4	A							
RR	16,9		B						

Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)

Kruskal Wallis Test GST									
Estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	STh (U/ mg P	MHW	14	0,28	0,12	0,25	9,79	4,95	0,0258
Primavera	STh (U/ mg P	RR	10	0,39	0,08	0,41	16,3		
Verano	STh (U/ mg P	MHW	7	0,27	0,06	0,27	6,57	0,69	0,4347
Verano	STh (U/ mg P	RR	7	0,3	0,13	0,3	8,43		
Otoño	STh (U/ mg P	MHW	18	0,39	0,16	0,4	17,47	10,33	0,0013
Otoño	STh (U/ mg P	RR	9	0,18	0,04	0,19	7,06		
Invierno	STh (U/ mg P	MHW	15	0,15	0,07	0,14	9,33	9,31	0,0022
Invierno	STh (U/ mg P	RR	10	0,25	0,05	0,27	18,5		
Treat. INV	Ranks			Treat. OTO	Ranks				
MHW	9,33	A		RR	7,06	A			
RR	18,5		B	MHW	17,47		B		
Treat. PRIM	Ranks								
MHW	9,79	A							
RR	16,3		B						

Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)

Kruskal Wallis Test AChE									
Estación	Variable	Tratamiento	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	(nmol/min.g	MHW	19	196,59	57,47	175,86	12,05	6,6	0,0102
Primavera	(nmol/min.g	RR	10	282,21	92,35	257,12	20,6		
Verano	(nmol/min.g	MHW	17	369,9	56,19	359,77	16	14,28	0,0002
Verano	(nmol/min.g	RR	7	126,94	15,04	128,4	4		
Otoño	(nmol/min.g	MHW	17	222,17	50,4	225,4	10	3,99	0,0457
Otoño	(nmol/min.g	RR	5	266,29	28,49	268,04	16,6		
Treat. PRIM	Ranks				Treat. OTO	Ranks			
MHW	12,05	A			MHW	10	A		
RR	20,6		B		RR	16,6		B	
Treat. VER	Ranks								
RR	4	A							
MHW	16		B						
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									

ANEXO CAPÍTULO 8

Utilización del SFG y el IBR para la integración de biomarcadores en índices de salud y *fitness* animal

Estadística descriptiva para el SFG luego de 12 días de exposición a medio control MHW, Cd o muestras provenientes del río Reconquista RR:

estación	Tratamiento	n	Media	S.D.	S.E.	CV	Minimos	Máximos
Primavera	Cd	7	-18,74	62,61	23,66	334,05	-154,09	38,44
	MHW	8	51,1	17,86	6,32	34,96	20,32	72,94
	RR	7	14	29,04	10,98	207,36	-19	55,85
Verano	Cd	4	-29,57	49,88	24,94	168,69	-99,98	16,66
	MHW	4	72,04	36,2	18,1	50,25	26,76	103,5
	RR	4	16,84	33,85	16,92	200,94	-23,67	56,22
Otoño	Cd	6	-301,48	194,74	79,5	64,59	-608,74	-74,08
	MHW	7	93,66	26,43	9,99	28,22	48,81	129,69
	RR	6	129,51	23,8	9,72	18,38	95,89	156,63
Invierno	Cd	4	-78,2	84,57	42,28	108,14	-154,74	42,53
	MHW	6	100,36	27,84	11,37	27,74	57,66	138,73
	RR	5	68,94	31,95	14,29	46,35	28,72	112,64

Prueba de Kruskal Wallis para SFG entre tratamientos (intra-ensayo):

Kruskal Wallis Test ANOVA NO PARAMETRICO									
estación	Variable	Tto	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Invierno	SFG	Cd	4	-78,2	84,57	-100,3	2,75	8,56	0,0138
Invierno	SFG	MHW	6	100,36	27,84	106,61	11,17		
Invierno	SFG	RR	5	68,94	31,95	60,05	8,4		
Treat.	Ranks								
Cd	2,75	A							
RR	8,4	A	B						
MHW	11,17		B						
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									
estación	Variable	Tto	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Otoño	SFG	Cd	6	-301,48	194,74	-321,62	3,5	13,62	0,0011
Otoño	SFG	MHW	7	93,66	26,43	97,55	11		
Otoño	SFG	RR	6	129,51	23,8	135,24	15,33		
Treat.	Ranks								
Cd	3,5	A							
MHW	11		B						
RR	15,33		B						
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									
estación	Variable	Tto	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Primavera	SFG	Cd	7	-18,74	62,61	-0,29	6,29	11,44	0,0033
Primavera	SFG	MHW	8	51,1	17,86	54,03	17,38		
Primavera	SFG	RR	7	14	29,04	9,53	10		
Treat.	Ranks								
Cd	6,29	A							
RR	10	A							
MHW	17,38		B						
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									
estación	Variable	Tto	N	Means	S.D.	Medians	Mean rank	H	p
Verano	SFG	Cd	4	-29,57	49,88	-17,47	3,5	6,62	0,0242
Verano	SFG	MHW	4	72,04	36,2	78,95	10		
Verano	SFG	RR	4	16,84	33,85	17,42	6		
Treat.	Ranks								
Cd	3,5	A							
RR	6	A	B						
MHW	10		B						
Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)									

Prueba de Kruskal Wallis para SFG de cada inter-ensayo:

Prueba de Kruskal Wallis TEST NO PARAMÉTRICO								
Tto	Variable	estación	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Cd	SFG	Invierno	4	-78,2	84,57	-100,3	9,74	0,0209
Cd	SFG	Otoño	6	-301,48	194,74	-321,62		
Cd	SFG	Primavera	7	-18,74	62,61	-0,29		
Cd	SFG	Verano	4	-29,57	49,88	-17,47		
Trat.	Ranks							
Otoño	4,67	A						
Invierno	11	A	B					
Verano	13,75		B					
Primavera	14,86		B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Tto	Variable	estación	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
MHW	SFG	Invierno	6	100,36	27,84	106,61	10,12	0,0175
MHW	SFG	Otoño	7	93,66	26,43	97,55		
MHW	SFG	Primavera	8	51,1	17,86	54,03		
MHW	SFG	Verano	4	72,04	36,2	78,95		
Trat.	Ranks							
Primavera	6,88	A						
Verano	11,5	A	B					
Otoño	16,57		B					
Invierno	18		B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								
Tto	Variable	estación	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RR	SFG	Invierno	5	68,94	31,95	60,05	16,13	0,0011
RR	SFG	Otoño	6	129,51	23,8	135,24		
RR	SFG	Primavera	7	14	29,04	9,53		
RR	SFG	Verano	4	16,84	33,85	17,42		
Trat.	Ranks							
Primavera	6,14	A						
Verano	6,5	A	B					
Invierno	13,8		B	C				
Otoño	19,17			C				
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)								

Valores de proteínas de Hígado y de cerebro para todos los tratamientos:

Estación	Tto	Proteínas H	Proteínas c	Estación	Tto	Proteínas	Proteínas c
Primavera	MHW	50,96	40,18	Verano	MHW	276,52	64,66
		359,96	21,12			267,56	64,66
		167,5	20,47			229,27	72,21
		463,82	19,58			198,23	72,21
		83,83	31,92			267,56	56,51
		141,87	29,81			261,86	58,79
		118,17	30,43			371,9	58,79
		172,43	30,49				59,5
		206,67	27,56				61,42
		218,92	32,77				69,94
		209,38	27,01				57,59
		196,36	19,55				61,52
		112,85	26,86				61,44
		153,09	33,06				60,98
			33,97				61,52
			37,89				54,94
			17,77				51,24
			24,63				
		17,03					
		109,84	17,03		285,26	64,08	
	RR	130,75	18,96		73,79	61,35	
		209,81	28,55		104,17	70,29	
		173,9	20,43		43,87	72,56	
		116,39	14,76		142,67	61,71	
		137,79	25,59		155,22	69,07	
		113,25	11,81		131,6	62,56	
		109,83	26,35		449,52	60,74	
		233,93	9,23		259,23	59,55	
		216,61	22,73		137,15	52,64	
	Cd	179,96	9,65		233,65	63,19	
210,52		38,46	357,4	63,68			
229,82		51,28	103,37				
200,58		26,84	459,28				
228,98		20,96	126,43				
201,32		42,59	310,5				
			317,28				

Estación	Tto	Proteínas	Proteínas c	Estación	Tto	Proteínas
Otoño	MHW	178,74	45,22	Invierno	MHW	381,23
		238,7	29,21			201,29
		261,99	39,09			371,57
		183,97	42,98			301,1
		153,41	47,17			193,74
		168,3	39,24			351,85
		93,19	55,63			412,03
		115,86	42,92			400,06
		171,48	37,08			582,57
		111,02	58,42			704,05
		93,93	54,47			868
		117,97	43,71			850,44
		107,26	27,46			614,69
		119,49	30,41			386,84
		129,92	32,26			322,63
		151,41	44,82			217,02
		100,51	40,95			57,41
		157,39				66,86
		109,41				96,13
		119,27	30,86			98,49
	143,02	35,43	88,58			
	156,6	30,98	102,39			
	166,42	35,2	104,06			
	156,05	36,7	139,81			
	193,08		76,44			
	143,05		142,98			
	257,11		172,96			
	270,25		111,72			
	Cd	Cd	141,5	37,48	Cd	142,63
			105,57	32,75		149,08
			99,25	37,24		130,56
			72,19	38,35		118,29
			122,11	31,01		234,86
148,25			42,89	119,65		
218,68			40,01	154,06		
74,59						
137,6						
150,38						

Bibliografía

Achiorno, C.L. (2010). Influencia de perturbaciones ambientales de origen antrópico sobre el ciclo de vida de *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP. 210 pp.

ACUMAR (2012). Autoridad de Cuenca Matanza-Riachuelo. Sistema de indicadores. Calidad de aguas superficiales de la Cuenca Matanza Riachuelo, parámetros físico-químicos y bacteriológicos. Campañas Mayo y agosto 2012. <http://www.ambiente.gov.ar>

Agbohessi, T.P.; Toko, I.I.; N'tcha, I.; Geay, F.; Mandiki, S.N.M.; Kestemont, P. (2014). Exposure to agricultural pesticides impairs growth, feed utilization and energy budget in African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. *Int. Aquat. Res.* 6, 229–243. doi:10.1007/s40071-014-00835.

Alcaraz G, Espina S (1997). Scope for growth of juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idella* exposed to nitrite. *Comp Biochem Physiol C.* 116:85–88.

Alves, L.C., Glover, C.N., Wood, C.M. (2006). Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51:615–625.

Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Dal Pai Silva, M., Alves Junior, R. (2001). Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environ Pollut* 114: 169-175.

Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G. (2004). Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecol. Lett.* 7, 363–368.

Amiard-Triquet, C. and Berthet, B. (2015). Individual Biomarkers. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Mouneyrac, C. (Eds.). *Aquatic Ecotoxicology, Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, Paris, pp. 153–182.

Amutha, C., Subramanian, P. (2013). Cadmium alters the reproductive endocrine disruption and enhancement of growth in the early and adult stages of *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol Biochem.* 39(2):351-61. doi: 10.1007/s10695-012-9704-3.

- APHA AWWA WEF (American Public Health Association) (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater. 21th ed. Washington, DC.
- APHA-AWWA (2010). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21 st Edition. Port City Press, Baltimore MD.
- Arreghini, S., de Cabo, L., Seoane, R., Tomazin, N., Serafini, R., de Iorio, A.F. (2007). A methodological approach to water quality assessment in an ungauged basin, Buenos Aires, Argentina. *GeoJournal* 70(4): 281-288.
- Arroyo, V.S., Flores, K.M., Ortiz, L.B., Gómez-Quiroz, L.E., Gutiérrez-Ruiz, M.C. (2012). Liver and cadmium toxicity. *J Drug Metab Toxicol*. S5:001. doi:10.4172/2157-7609.S5-001.
- Ascar, M.I. (2006). Biomarcadores hepáticos de *Cyprinus carpio*: un estudio de línea de base. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. 83 pp.
- Baker, C.F., Montgomery, J.C. (2001). Sensory deficits induced by cadmium in banded kokopu, *Galaxias fasciatus*, juveniles. *Environmental Biology of Fishes* 62: 455-464.
- Balk, L., Larsson, Å., Förlin, L. (1996). Baseline studies of biomarkers in the feral female perch (*Perca fluviatilis*) as tools in biological monitoring of anthropogenic substances. *Mar Environ Res* 42: 203-208.
- Barhoumi, S., Messaoudi, I., Deli, T., Said, K., Kerkeni, A. (2009). Cadmium bioaccumulation in three benthic fish species, *Salaria basilisca*, *Zosterisessor ophiocephalus* and *Solea vulgaris* collected from the Gulf of Gabes in Tunisia. *J. Environ. Sci.* 21:980–984.
- Basilico, G.O. (2014). Evaluación del impacto de ingresos puntuales de contaminantes en arroyos de llanura y pautas para su remediación: Tesis Doctoral. Universidad Nacional de General Sarmiento.
- Battaglini, P., Andreozzi, R., Antonucci, R., Arcamone, N., De Girolamo, P., Ferrara, L., Gargiulo, G. (1993). The effects of Cadmium on the gills of the goldfish *Carassius auratus* L.: metal uptake and histochemical changes. *Comp Biochem Physiol* 104C: 239-247.

Baudhuin P., Beaufy H., Rahman-Li Y., Sellinger O.Z., Wattiaux R., Jacques P., De Duve C. (1964). Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, alanine aminotransferase, d-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochem J* 92: 179-184.

Baudou, F., Ossana, N., Castañé, P., Mastrángelo, M., Ferrari, L. (2017). Cadmium effects on some energy metabolism variables in *Cnesterodon decemmaculatus* adults. *Ecotoxicology* (9), 1250–1258.

Baudou, F., Ossana, N., Castañé, P., Mastrángelo, M., Gonzales, A.A., Palacio, M., Ferrari, L. (2018). Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. *Science of the Total Environment* 650 (2019) 1779–1786.

Beauvais, S.L., Cole, K.J., Atchison, G.J., Coffey, M. (2002). Factors affecting brain cholin esterase activity in blue gill (*Lepomis macrochirus*). *Water Air Soil Pollut.* 135,249–264.

Begum, G.; Vijayaraghavan, S. (1999). Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide roger on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Environ. Res.* 80, 80.

Beliaeff, B. & T. Burgeot (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology Chemistry*, 21: 1316-1322.

Bentley, P.J. (1991). Accumulation of Cadmium by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influx from environmental solutions. *Comp Biochem Physiol* 99C: 527-529.

Berón, L. (1984). Evaluación de la calidad de las aguas de los ríos de la Plata y Matanza-Riachuelo mediante la utilización de índices de calidad de agua. Secretaría de Vivienda y Ordenamiento Ambiental. Ministerio de Salud y Acción Social, Argentina.

Berois, N. (1993). Reproducción y nutrición embrionaria en *C. decemmaculatus* (Teleostei: Poeciliidae). *Rev. Brasil. Biot.* 55 (I):27-44.

Biswas, A.K. (2005). An assessment of Future Global Water Issues. *Journal of water Resources Development*. Vol. 21, num. 2.

Bonifacio, A.F. (2017). Tesis: Evaluación del efecto individual y conjunto de los agroquímicos clorpirifós (Clorfox®) y glifosato (Roundup Max®) sobre *Cnesterodon decemmaculatus* a través del

uso de biomarcadores a distintos niveles de organización biológica. Tesis Doctoral. Facultad de ciencias exactas, físicas y naturales, Universidad Nacional de Córdoba. 118 pp.

Bonifacio, A.F., Cazenave, J., Bacchetta, C., Ballesteros, M.L., Bistoni, M.A., Amé, M.V., Bertrand, L., Hued, A.C. (2016). Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to comercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecol. Indic.* 67, 88-97.

Borges, A.; Scotti, L. V; Siqueira, D.R.; Zanini, R.; Amaral, F. Do; Jurinitz, D.F.; Wassermann, G.F. (2007). Changes in hematological and serum biochemical values in jundiá *Rhamdia quelen* due to sub-lethaltoxicity of cypermethrin. *Chemosphere* 69, 920–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.068.

Borthagaray, J.M., Fernández Prini, R., Igarzábal de Nistal, M.A., San Román, E., Tudino, M. (2001). Diagnóstico ambiental del área metropolitana de buenos Aires. Sistema de información ambiental. Facultad de Arquitectura, Diseño y Urbanismo. UBA. Buenos Aires, Argentina.

Bradbury, S.P., Carlson, R.W., Henry, T.R., Padilla, S., Cowden, J. (2008). Toxic responses of the fish nervous system. In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*. CRC Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. pp. 417–455.

Brooks, B.W., Riley, T.M., Taylor, R.D. (2006). Water quality of effluent-dominated ecosystems: ecotoxicological, hydrological, and management considerations. *Hydrobiologia* 556: 365-379.

Buikema, A.L., Niederlehner B.R., Cairns, J. (1982). Biological monitoring: Part IV. Toxicity testing. *Water Research*, 16, 239-262.

Carballo, C.T. (2010). Información ambiental de la Cuenca del río Luján. Ed Prometeo, Bs As, Argentina.

Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G.M., Tilman, D., Wardle, D.A. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486, 59–67.

Castané, P.M., Lopez, C.R., Olguin, H.F., Puig, A., Rovedatti, M.G., Topalián, M.L., Salibián, A. (1998a). Caracterización y variación espacial de parámetros fisicoquímicos y del plancton en un río urbano contaminado (Río Reconquista, Argentina). *Rev. Int. Contam. Ambient* 14, 69–77.

Castané, P.M., Topalián, M.L., Rovedatti, M.G., Salibián, A. (1998b). Impact of human activities on the water quality of the Reconquista river (Buenos Aires, Argentina). *Verh. Int. Verein. Limnol.* 26, 1206–1208.

Castillo Morales, G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, Inter calibración, resultados y aplicaciones/Gabriela Castillo (ed.). - México: IMTA, 189 p. ISBN 968-5536-33-3.

Cavas, T., Garanko, N.N., Arkhipchuk, V.V. (2005). Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to Cadmium chloride and Copper sulphate. *Food Chem Toxicol* 43:569–574.

Cazenave, J.; De Los Ángeles Bistoni, M.; Zwirnmann, E.; Wunderlin, D.A.; Wiegand, C., (2006). Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos - Benefits and costs of microcystin detoxication. *Environ. Toxicol.* 21, 22–32. doi:10.1002/tox.20151.

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). *Environ Pollut* 157: 3025-3033.

Chapman, A.D. (2009). Numbers of Living Species in Australia and the World, 2nd edition. Australian Biodiversity Information Services ISBN (online) 9780642568618.

Choong, G; Liu, Y; Douglas M. Templeton (2014). Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 211, 54–65.

Chuiko, G.M., Zhelnin, Y., Gornaya, V.A. (1997). Seasonal fluctuations in brain acetyl cholin esterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus* L.): A freshwater fish from North west Russia. *Comp. Biochem. Physiol.* 117C, 251–257.

CITEDIC (2017). <https://serv.cidetic.unlu.edu.ar/ibr#info>

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.

Conzonno V. (2010). *Limnología Química*. Ed. Universidad Nacional de La Plata, La Plata

Couture, P., Rajotte, J.W. (2003). Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from Sudbury, Ontario: A review. *J Environ Monit* 5: 216-221.

Da Cruz, A.L., Matos Prado, T., Aguilar da Silva Maciel, L., David Couto, R. (2015). Environmental effects on the gills and blood of *Oreochromis niloticus* exposed to rivers of Bahia, Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 23–31.

De Almeida, E.A., Marques, S.A., Klitzke, C.F., Bairy, A.C.D., De Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., De Melo Loureiro, A.P. (2003). DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comp Biochem Physiol Part C* 135:295–303.

De Boeck G., De Smet H., Blust R. (1995). The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquat. Toxicol* 32:127–141.

De Boeck G., Liew H.J., Sinha A.K., Mauro N., Diricx M., Blust R. (2012). Fasting goldfish, *Carassius auratus*, and common carp, *Cyprinus carpio*, use different metabolic strategies when swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 163 (2012) 327–335.

De la Torre, F.R., Demichelis, S.O., Ferrari, L., Salibian, A. (1997). Toxicity of Reconquista river water: bioassays with juvenile *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 58:558–565.

De la Torre F., Ferrari L., Salibián A. (2000). Long-term in situ water toxicity bioassays in the Reconquista river (Argentina) with *Cyprinus carpio* as sentinel organism. *Water Air Soil Pollut* 121: 205-215.

De la Torre, F.R., Ferrari, L., Salibian, A. (2002). Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comp Biochem Physiol C.* 131:271–280.

De la Torre F.R., Ferrari L. y Salibián A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*): application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere* 59(4):577-583.

De la Torre, F.R., Salibian, A., Ferrari, L. (2007). Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere*. 68:1582–1590.

Defensor del Pueblo de la Nación (2003) Matanza-Riachuelo: la cuenca en crisis. Primera parte.

Delfino Vieira, C.E, Almeida M., Galindo B.A. (2014). Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotropical Ichthyology*, 12(1): 153-164.

Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L. Miguez, L. & Pain-Devin, S. (2014). The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environ Sci Pollut Res* 21:2448–2454. DOI 10.1007/s11356-013-2169-9

Devlaming, V., Grossman, G., Chapman, F. (1982). On the use of the gonosomatic index. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* 73, 31–39. Dietrich.

Di Giulio, R.T., Meyer, J.N. (2008). Reactive oxygen species and oxidative stress, In: *The toxicology of fishes*. Di Giulio RT, Hinton DE (Eds). Taylor & Francis. Boca Raton, FL, p 273-324.

Di Pace, M., Crojethovich, A. (2001). La Región Metropolitana de Buenos Aires vista como un sistema complejo. Propuesta metodológica para el análisis de la sustentabilidad de los recursos hídricos. En: Secretaría de Investigación, Universidad Nacional de Gral. Sarmiento, Problemas de Investigación, Ciencia y Desarrollo, p 199-218.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W., InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>

Dickson T.R. (1994). *Química, Enfoque Ecológico*. Editorial Limusa. Noriega Editores. México, D.F. 406 pp.

Doyle, C.J., Lim, R.P. (2002). The effect of 17 β -estradiol on the gonopodial development and sexual activity of *Gambusia holbrooki*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2719–2724.

Durieu S., J., Wolff, S., Dillin, A. (2010). The Cell-Non-Autonomous Nature of Electron Transport Chain-Mediated Longevity. *Cell* 144, 79–91, January 7, 2011 ©2011 Elsevier Inc.

EC (Environment Canada) (1990). Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants. Environmental Protection Series. Report: EPS 1/RM/12.

Eissa, B.L. (2008). Biomarcadores comportamentales, fisiológicos y morfológicos de exposición al cadmio en peces pampeanos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. 195 pp.

Eissa, B.L., Ossana, N.A., Ferrari, L., Salibián, A. (2010). Quantitative behavioural parameters as toxicity biomarkers: fish responses to water borne cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 84,712–715.

Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andreas, V.Jr. y Feathersone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.

Escalona, L., Winchester, J.W. (1994). La tendencia de la urbanización en Sur América: inferencias a partir de una base de datos del “World Resources Institute”. *Interciencia* 19: 64-71.

Espina S., Salibian A., Díaz F. (2000). Influence of cadmium on the respiratory function of the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Water Air Soil Pollut* 119:1–10.

Espina S., Vanegas C. (2005). Ecotoxicología y contaminación, pp.79-120. Int, A. V. Bottello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal. Autón. De México, Instituto Nacional de Ecología. 695 pp.

Evers, C., Lopez, J., Gómez, N., Rodrigues, Janiot, L.J. (1997). Calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata (San Fernando-Magdalena). Consejo Permanente para el monitoreo de la calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata.

Faucher, K., Fichet, D., Miramand, P., Lagardere, J.P. (2006). Impact of acute cadmium exposure on the trunk lateral line neuromast and consequences on the "C-Start" response behaviour of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.; Teleostei, Moronidae). *Aquat Toxicol* 76: 278-294.

Ferrari, L., García, M.E., de la Torre, F.R., Demichelis, S.O. (1998). Evaluación ecotoxicológica del agua de un río urbano mediante bioensayos con especies nativas. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.* n.s. 148: 1-16.

Ferrari, L., Salibián, A. (1999). Effect of cadmium on the epidermic structure of *Bufo arenarum* tadpoles: influence of the chemical composition of the incubation media. *Arch Physiol Biochem* 107: 91-96.

Ferrari, L., de la Torre, F.R., Demichelis, S.O., García, M.E., Salibián, A. (2005). Ecotoxicological assessment for receiving waters with the premetamorphic tad poles acute assay. *Chemosphere*, 59, 4: 567-575. doi: 10.1016/j.chemosphere.

FERRARI, L., EISSA B L, SALIBIÁN A., BORGNIA, M. (2006). Bioindicadores de contaminación acuática: parámetros morfológicos y fisiológicos de peces. *Salud ambiental y humana. Una visión holística*. SETAC Latinoamérica. Herkovits, J (Ed) (ISBN 10:987-05-1959-8). 106-108.

Ferrari, L., (2006). Generalidades sobre ecotoxicología. Capítulo de libro En *Principios de Genética Toxicológica*. (Mudry, M Carballo M. Ed) Buenos Aires, Editorial de los Cuatro Vientos, pp 393-421 (ISBN 987-564-563-X).

Ferrari, L., Eissa, B.L., Ossana, N.A., Salibián, A. (2009). Effects of sublethal waterborne Cadmium on gills in three teleostean species: scanning electron microscope study. *Int J Environ Health* 3:410-426.

Ferrari, L., Eissa, B.L., Salibián, A. (2011). Energy balance of juvenile *Cyprinus carpio* after a short-term exposure to sublethal water-borne cadmium. *Fish Physiology and Biochemistry* 37:853–862.

Ferrari, L. (2015). La Ecotoxicología aplicada a la evaluación de la contaminación de los ríos: el caso del Río Reconquista. *Ciencia e Investigación* 65 (2), 17-37. (ISSN: 0009-6733) <http://aargentinpencias.org/2/index.php/revistas-cei/894>.

Ferrari, L. (Ed) Benítez, J., Ficella, M., Somma, A., Palacio, M., Tripoli, L. (2017). Manual de procedimiento básico para la cría de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio. - 1a ed. - Luján: EdUnLu, Libro digital, ISBN 978-987-3941-20-7. 48 pp.

Finney, D.J. (1978). Statistical method in biological assay, 3ra ed. London: Griffin.

Flik, G., Van de Winkel, J.G.J., Part, P., Wendelaar Bonga, S.E., Lock, R.A.C. (1987). Calmodulin mediated Cadmium inhibition of phosphodiesterase activity. *Arch Toxicol* 59: 352-359

Flora, S.J.S., Mittal, M., Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research* 128:501–523.

Foguelman, D., Brailovsky, A.E. (1999). Buenos Aires y sus Ríos. El agua en el Área Metropolitana. Lugar Editorial. Buenos Aires, Argentina.

Forbes, V.E., Forbes, T.L. (1994). Ecotoxicology in Theory and Practice. Ecotoxicology Series 2. Chapman and Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 HN, UK.

Foulkes, E.C. (1986). Cadmium. Springer-Verlag.

Fournie V., Gouillou-Coustans M.F., Métailler R., Vachot C., Moriceau J., Le Delliou H., Huelvan C., Desbruyeres E., Kaushik S.J. (2003). Excess dietary arginine affects urea excretion but does not improve N utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and turbot *Psetta maxima*. *Aquaculture* 217:559–576.

García M.E. (2009). Estudio del efecto de la contaminación sobre invertebrados del complejo zoobentónico en arroyos de la llanura pampeana. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Bs.As., Argentina. 322pp.

Garnier, J., Leporcq, B., Sanchez, N., & Philippon, X. (1999). Biogeochemical budgets in three large reservoirs of the seine basin (Marne, Seine and Aube reservoirs). *Biogeochemistry*, 47, 119–146.

GIUSTO.A, SOMMA, L A. and FERRARI L. (2012). Cadmium Toxicity assessment in juveniles of the Austral South America amphipod *Hyalella curvispina*. *Ecotoxicological and Environmental Safety*. 79:163-169.

- Giusto A, Salibian A, Ferrari L. (2014). Biomonitoring toxicity of natural sediments using juvenile *Hyalella curvispina* (Amphipod) as test species: evaluation of early effect endpoints. *Ecotoxicology* 23: 293-303.
- Goede, R.W., Barton, B.A. (1990). Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8, 93–108.
- Gómez S, Villar C, Bonetto C. 1998. Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Río de La Plata estuary. *Environ Pollut.* 99:159–165.
- Goren, M. & Galil, B.S. (2015). A checklist of the deep sea fishes of the Levant Sea, Mediterranean Sea. *Zootaxa* 3944(4): 507–530. doi: 10.11646/zootaxa.3944.4.2.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, E.B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Harrison, J. A., Maranger, R. J., Alexander, R. B., Giblin, A. E., Jacinthe, P. A., Mayorga, E. (2009). The regional and global significance of nitrogen removal in lakes and reservoirs. *Biogeochemistry*, 93, 143–157.
- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: *Functional metabolism: regulation and adaptation*, Storey HB (Ed) p 319-368.
- Hickman, C.P., Ober, W.C. & Garrison, C.W. (2006). *Principios integrales de zoología*, 13.ª edición. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid (etc.), XVIII+1022 pp. ISBN 84-481-4528-3.
- Hickman, C.P., Ober, W.C. & Garrison, C.W. (2009). *Principios integrales de zoología*, 14.ª edición. McGraw-Hill-Inter-americana, Madrid.
- Hooda, P., Edwards, A., Anderson, H., Miller, A. (2000). A review of water quality concerns in livestock farming areas. *The Science of the total Environment* 250:143-167.
- 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, 327–341.
- Hoskins, L.J., Volkoff, H. (2012). The comparative endocrinology of feeding in fish: insights and challenges. *Gen. Comp. Endocrinol.* 176, 327–335.

Hued, A.C., Bistoni, M.D.L.Á. (2005). Development and validation of a biotic index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia*, 279–298, <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-004-7893-1>.

Hued, A., Dardanelli, S., Bistoni, M. (2010). Temporal and spatial variability of fish assemblages in a river basin with an environmental degradation gradient. *Community Ecol.* 11:41–50. <https://doi.org/10.1556/ComEc.11.2010.1.7>.

Hued, A.C., Lo Nostro, F.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M. de los Á. (2013). Reproductive impairment of a viviparous fish species inhabiting a freshwater system with anthropogenic impact. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64:281–290. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9826-8>.

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993) Cadmium and Cadmium Compounds. IARC monograph Eval carcinog Risk Hum 58:119-238.

INDEC (2010). <http://www.indec.mecon.ar>.

Informe de la Defensoría del Pueblo de la Nación (2007). Cuenca del río Reconquista 1º Parte. Informe Especial.

IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación). (2008). Calidad Ambiental-Calidad de agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. Norma No 29112/2008.

Janssen, M.P.M., Bruins, A., De Vries, T.H., Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch Environ Contam Toxicol* 20: 305-312.

Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., Schulz, R. (2005). Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural stream in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61(6):817-826.

Jobling, S., Tyler, C.R. (2003). Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure Appl. Chem.* 75:2219–2234. <https://doi.org/10.1351/pac200375112219>.

Kraal, M.H., Kraak, M.H., De Groot, C.J., Davids, C. (1995). Uptake and tissue distribution and aqueous Cadmium by carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 31: 179-183.

Kruse, E., Laurencena, P., Varela, L., Rojo, A. (2003). Agua subterránea en el Área metropolitana de Buenos Aires. En: Griselda Alsina (organizadora). Las aguas bajan turbias en la región metropolitana del Gran Buenos Aires. Universidad Nacional de General Sarmiento 29-41.

Lacoste, C., Collasius, D. (1995). Instrumentos de diagnóstico ambiental: índice de calidad de agua. Gerencia Ambiental 24: 286–293.

Lagadic, L., Caquet, J.C., Amiard, F. Ramade (eds). (1997). Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, Paris.

Larsson, A., Bengtsson, B.E., Haux, C. (1981). Disturbed ion balance in flounder, *Platichthys flesus* L. exposed to sublethal level of cadmium. Aquatic Toxicology. 1: 19-35.

Linde-Arias, A. R., A. F. Inácio, L. A. Novo, C. de Albuquerque, and J. C. Moreira (2008) Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. Environ. Pollut. 156, 974–979.

Livingstone, D.R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. Chemical Technology and Biotechnology, 57, 3: 195-211. <https://doi.org/10.1002/jctb.280570302>.

Lopretto E.C., Tell G. (Eds) (1995). Ecosistemas de Aguas Continentales. Metodologías para su estudio. Ediciones Sur, La Plata.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr AL, Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.

Lu, G. H., Qi, P. D. and Chen, W. (2013). Integrated Biomarker Responses of *Carassius auratus* Exposed to BDE-47, BDE-99 and Their Mixtures. Int. J. Environ. Res., 7(3):807-816, Summer 2013 ISSN: 1735-6865.

Lucinda, P.H.F., 2005. Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). Neotrop. Ichthyol. 303–311.

Lushchak, V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat Toxicol 101: 13-30.

Ma X.Y, J. Qiang, J. He, N.N. Gabriel, P. Xu. (2015). Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. *Fish Physiol Biochem.* 41:937–950. DOI 10.1007/s10695-015-0059-4

MASTRANGELO, M, DOS SANTOS AFONSOS, M, FERRARI, L. (2011). Cadmium toxicity in tadpoles of *Rhinella arenarum* in relation to calcium and humic acid. *Ecotoxicology* 20:1225-1232. DOI 10.1007/s10646-011-0667-4

Mastrángelo, M., Ferrari, L. (2013). *Cnesterodon decemmaculatus* Juveniles as test organisms in toxicity assessment: Cadmium case. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91:49–54.

Maggioni, T., Hued, A.C., Monferrán, M.V., Bonansea, R.I., Galanti, L.N., Amé, M.V. (2012). Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middlelower basin of the Suquía river (Córdoba, Argentina). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 337–353.

Mebane, C.A. (2006). Cadmium risks to freshwater life: derivation and validation of low-effect criteria values using laboratory and field studies YR. *Scientific Investigations Report* 8:130.

Menéndez-Helman, R.J., Ferreyroa, G.V., dos Santos Afonso, M., Salibián, A. (2012). Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 6–9, <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-011-0423-8>.

Menéndez-Helman R. J. (2015). Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 111: 236–241.

Minshall, G.W., Cummins, K.W., Petersen, R.C., Cushing, C.E., Bruns, D.A., Sedell, J.R., Vannote, R.L. (1985). Developments in stream ecosystem theory. *Can J Fish Aquat Sci* 42: 1045-1055.

Momo, F., Ventura, A., Maccor, T. (2003). Estado ecológico de la cuenca del Río Luján. En: *Las aguas bajan turbias en la Región Metropolitana del Gran Buenos Aires*. Griselda Alsina (Ed). Universidad Nacional de General Sarmiento p 103-112.

Moraes BS, Loro VL, Gluszczak L, Pretto A, Menezes C, Marchezan E, Machado SO (2007) Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 68: 1597-1601.

Morales Cazan, A., Klerks, P.L. (2015). Effects from a short-term exposure to copper or cadmium in gravid females of the livebearer fish (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicol Environ Saf* 118: 199-203.

Moreira SM, Guilhermino L (2005).The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione-S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the Northwest Portuguese coast. *Environ Monit Assess* 105: 309-325.

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

Nahrgang, J., Camus, L., Broms, F., Christiansen, J.S., Hop, H. (2010). Seasonal baseline levels of physiological and biochemical parameters in polar cod (*Boreogadus saida*): Implications for environmental monitoring. *Mar Pollut Bull* 60: 1336-1345.

Newman, M.C. (2001). *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers.

Newman, M.C., Clements, W.H. (2008). *Ecotoxicology. A comprehensive treatment*. Taylor & Francis Group. Boca Raton, F.L.

Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139.

Oliveira, A.M., Maria, V.L., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M., Santos, M.A. (2009). Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata*. An integrated biomarker approach. *Environ. Pollut.* 157, 959–967.

Ollson, P.E., Larsson, A., Haux, C. (1996). Influence of seasonal changes in water temperature on cadmium inductibility of hepatic and renal metallothionein in rainbow trout. *Mar Environ Res* 42: 41-44.

Ossana, N.A., Eissa, B.L., Salibian, A. (2009). Short communication: Cadmium bioconcentration and genotoxicity in the common carp (*Cyprinus carpio*). International Journal of Environment and Health 3:302.

Ossana, N.A. (2011). Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Museo. UBA. 206 pp.

Ossana, N.A., Castañé, P.M., Salibián, A. (2013). Use of *Lithobates catesbeianus* tad-poles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista river (Argentina). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 65,486–497.

Ossana, N.A., Eissa, B.L., Baudou, F.G., Castañé, P.M., Soloneski, S., Ferrari, L. (2016). Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. Ecotoxicol. Environ. Saf. 133, 73-81.

Ossana N.A, Baudou F.G. (2019). Histological, Genotoxic, and Biochemical Effects on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae): Early Response Bioassays to Assess the Impact of Receiving Waters. Journal of Toxicology. Volume 2019, Article ID 4687685, 13 pages.

Owen S.F., Houlihan D.F., Rennie M.J., van Weerd J. H. (1998). Bioenergetics and nitrogen balance of the European eel (*Anguilla anguilla*) fed at high and low ration levels. Can J Fish Aquat Sci 55:2365–2375.

Pankhurst, N. W. & Van Der Kraak, G. (1997). Effects of stress on reproduction and growth of fish. Fish stress and health in aquaculture, 73-93.

Peles J.D., Pistole, D.H., Moffe, M. (2012). Influence of cadmium concentration and length of exposure on metabolic rate and gill Na⁺/K⁺ ATPase activity of golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*). Comp Biochem Physiol C 156: 24–28.

PELUSO L., GIUSTO A., BULUS ROSSINI G. D., FERRARI, L SALIBIÁN A. y RONCO A E. (2011). *Hyalella curvispina* (Amphipoda) as a test organism in laboratory toxicity testing of environmental samples. Fresen. Environ. Bull. 20(2): 372-376.

Penttinen S., Malk V, Vaisänen A., Penttinen O.P. (2011). Using the critical body residue approach to determine the acute toxicity of cadmium at varying levels of water hardness and dissolved organic carbon concentrations. *Ecotoxicol Environ Safe* 74:1151–1155.

Pi, J., Li, X., Zhang, T., Li, D. (2016). Effects of Acute Exposure to Sublethal Waterborne Cadmium on Energy Homeostasis in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 97:497–503. DOI 10.1007/s00128-016-1896-2.

Rand, G.M., Wells, P.G., McCarty, L.S. (1995). Chapter 1. Introduction to Aquatic Toxicology. En *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Segunda Edición. Editado por G. M. Randme.

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

Rani, A. (2014). Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International journal of environmental health research* 24:378–99.

Repetto, M. (1995). *Toxicología Avanzada*. Ediciones Diaz de Santos. Madrid.

Richards, J.G., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (2009). *Fish Physiology: Hipoxia*, Academic Press. San Diego, CA.

Richetti, S.K., Rosemberg, D.B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J.M., Bogo, M.R., Bonan, C.D. (2011). Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebra fish brain is altered by heavy metal exposure. *Neuro Toxicology* 32 (1), 116–122.

Rigacci, L.N., Giorgi, A., Vilches, C., Ossana, N.A., Salibián, A. (2013). Effect of are-servoir in the wáter quality of the Reconquista River, Buenos Aires, Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 185,9161–9168.

Roast S.D., Widdows J., Jones M.B. (1999). Scope for growth of the estuarine mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea): effects of the organophosphate pesticide chlorpyrifos. *Mar Ecol Progr Ser* 191:233–241.

Rosas, C., Sánchez, A., Chimal, M. E., & Brito, R. (2003). Manual de Métodos para la Evaluación del Balance Energético en Crustáceos, 1–43.

Rueda-Jasso, R., Conceição, L. E. C., Dias, J., De Coen, W., Gomes, E., Rees, J. F., Sorgeloos, P. (2004). Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture*, 231 (1-4), 417–433. doi:10.1016/S0044-8486(03)00537-4.

Sadañiowski, I. (2003). El problema de las inundaciones en la cuenca del río Reconquista: la represa Ing. Carlos F. Roggero y las funciones ecológicas. Tesis de Licenciatura en Ecología Urbana. Universidad Nacional de General Sarmiento.

Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., Cavalheiro de Menezes, C., Lazzari, R., Radunz, J., Baldisseriotto, B., Loro, V.L. (2010). Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and haematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 740–745.

Saleh, S.Y., Assem, S.M., Marie B. (2016). Use of *Arius thalassinus* fish in a pollution biomonitoring study, applying combined oxidative stress, hematology, biochemical and histopathological biomarkers: A baseline field study. *Mar Pollut Bull.* 2016 May 15;106(1-2):308-22. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.03.030.

Salibián, A. (2006). Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista river of Argentina. In: *Revs Environ Contam Toxicol.* Ware GW (Ed) New York: Springer, 185: 35-65.

Sanchez, W., Piccini, B., Ditche, J.M., Porcher, J.M. (2008). Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus L.*) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environ Int* 34: 791-798.

Sanchez, W. y Porcher, J.M. (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *Trends in Analytical Chemistry* 28: 150-158.

Sancho, E.; Ferrando, M.D. (2015). Energy reserves mobilization in the yellow eel as herbicide exposure effect. *Chemosphere* 135, 94–100. doi: 10.1016/j.chemosphere. 2015.03.032

Sandin, L., Solimini, A.G. (2009). Freshwater ecosystem structure—function relationships: from theory to application. *Freshw. Biol.* 54, 2017–2024.

Sardi A.E, Renauda, P.E, Lana, P.C., Camus, L (2016). Baseline levels of oxidative stress biomarkers in species from a subtropical estuarine system (Paranaguá Bay, southern Brazil). *Mar. Poll. Bull.*

Scandalios, J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signal triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995-1014.

Scarcia, P. (2014). Tesis: 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. UBA. 273 pp.

Scarlet, M.P.J., Halldórsson, H.P., Granmo, A. (2015). *Scope for growth* and condition index in the clam *Meretrix meretrix* as biomarkers of pollution in Espírito Santo Estuary, Mozambique. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 1, 63–67.

Schlenk, D., Handy, R., Steinert, S., Depledge, M., Benson, W. (2008). Biomarkers, In: Di Giulio R T, Hinton D E (eds) *The Toxicology of Fishes*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 683–715.

Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E.P., George, S., James, M., Kullman, S.W., van den Hurk, P., Willet, K. (2008b), Biotransformation in fishes. In: *The Toxicology of Fishes*. Di Giulio RT, Hinton DE (Eds). Taylor & Francis. Boca Raton, FL, p 153-234.

Scott G.S., Sloman, K.A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioral and physiological indicators of toxicity. *Aquat Toxicol* 38: 369-392.

Selye, H. (1956). *The Stress of Life*. McGraw-Hill Book Company, New York.

Seoáñez Calvo M. (1996). Ingeniería del medio ambiente aplicada al medio Natural continental. La contaminación del medio natural continental: aire, aguas, suelos, vegetación y fauna: Tecnologías de identificación, lucha y corrección. Co-edición. Ediciones Munci-Prensa, Análisis y Trabajos Prospectivos, S.L. Distribución Grupo Mundi-Prensa. 701 pp.

Sloman, K.A., Scott, G.R., Diao, Z., Rouleau, C., Wood, C.M., McDonald, D.G. (2003b) Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol* 65:171–185.

Sloof 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. *Aquat Toxicol* 4: 1-14.

Smolders, R., Bervoets, L., De Boeck, G. (2002). Integrated condition indices as measure of whole effluent toxicity in zebra fish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 21:87–93.

Tao, S., Liu, W.X., Liu, G.J., Dawson, R., Cao, J., Wong, P.K. (2006). Shortterm dynamic change of gill copper in common carp, *Cyprinus carpio*, evaluated by a sequential extraction. *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 51, 408–415.

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. *Environ Pollut* 121: 307-320.

Tierney KB, Baldwin DH, Hara TJ, Ross SP, Scholz NL, Kennedy CJ (2010). Olfactory toxicity in fish review. *Aquat Toxicol* 96:2–26.

Tilman, D., Isbell, F., Cowles, J.M. (2014). Biodiversity and ecosystem functioning. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 45, 471.

Timbrell, J.A. (2009). Toxic responses to foreign compounds. In: *Principles of biochemical toxicology*. Informa Healthcare, New York, p 193-292

Toft, G., Edwards, T.M., Baatrup, E., Guillette, L.J. (2003). Disturbed sexual characteristics in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a lake contaminated with endocrine disruptors. *Environ. Health Perspect.* 111:695–701. <https://doi.org/10.1289/ehp.6022>.

Truhaut, R. (1977). "Eco-Toxicology - Objectives, Principles and Perspectives". *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 1 (2): 151–173. doi:10.1016/0147-6513(77)90033-1.

Tseng, Y.C., & Hwang, P.P. (2008). Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 148(4), 419–29. doi: 10.1016/j.cbpc.2008.04.009.

Tyler Miller G. Jr. (1994). *Ecología y Medio Ambiente. Introducción a la Ciencia Ambiental, el Desarrollo Sustentable y la Conciencia de Conservación del Planeta Tierra*. Grupo Editorial

Iberoamérica S.A. de C.V. ISBN 970-625-027-1. Versión en español de la obra Living in Environment – An Introduction to Environmental Science. G. Tyler Miller, Jr. / Seventh Edition. Edición original en inglés publicada por Wadsworth Publishing Company. 1992 en Estados Unidos de América

Ueng, Y.F., Liu, C., Lai, C.F., Meng, L.M., Hung, Y.Y. and Ueng, T.H. (1996). Effects of cadmium and environmental pollution on metallothionein and cytochrome P450 in tilapia. B. Environ. Contam. Tox. 57: 125-131.

Uliano E., Cataldi M., Carella F., Migliaccio D., Iaccarino D., Agnisola C. (2010). Effects of acute changes in salinity and temperature on routine metabolism and nitrogen excretion in gambusia (*Gambusia affinis*) and zebrafish (*Danio rerio*). Comp Biochem Physiol A157:283–290.

UNESCO. El agua, una responsabilidad compartida. 2º informe sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo. (2006). Disponible a:<http://www.unesco.org/water/wwap/wwdr2/table_contents_es.shtml>. [Consulta 13 de julio de 2007].

US EPA (1985). Ambient water quality criteria for cadmium. EPA 440/5-84-032. National Technical Information Service, VA.

US Environmental Protection Agency (US EPA) 1993. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Fresh Water and Marine Organisms. U.S.EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.

US Environmental Protection Agency (US EPA) (1994). Short –term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to fresh organisms. Third Edition. Washington, D.C.

US Environmental Protection Agency (USEPA). (2001). Update of the ambient water quality criteria for cadmium. Washington, D.C., U.S. EPA/822/R-01-001, 266 p.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 64(2), 178–89. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.

Valerio-García, R.C., Carbajal-Hernández, A.L., Martínez-Ruiz, E.B., Jarquín-Díaz, V.H., Haro-Pérez, C., Martínez-Jerónimo, F. (2017). Exposure to silver nanoparticles produces oxidative stress and

affects macromolecular and metabolic biomarkers in the goodeid fish *Chapalichthys pardalis*. *Sci. Total Environ.* 583, 308–318.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13 (2): 57-149.

Van Dyk, J.S., Pletschke, B. (2011). Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere* 82, 291–307.

Van Gestel, C.A., Van Brummelen, T.C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*. Aug; 5 (4): 217-25. doi: 10.1007/BF00118992.

Vargas, F., Rivas, C., Nursamaa, A., Zoltan, T. (2007). Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Revisión Bibliográfica. Avances en Química*, 2(2), 3-15.

Vega M.A., Díaz F., Espina S. (2004). Energetic balance in *Chirostoma estor estor* (Jordan, 1879) (Pisces, *Atherinopsidae*) juveniles in relation to size. *Hidrobiológica*, 14 (2): 113-120.

Vera-Candioti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L. (2013). Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted livebearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*

Verbost, P.M., Flik, G., Fenwick, J.C., Greco, A.M., Pang, P.K.T., Wendelaar Bonga, S.E. (1993). Branchial calcium uptake: possible mechanisms of control by stanniocalcin. *Fish Physiol Biochem* 11: 205-215.

Vergilio, C.S. (2014). Evolution of cadmium effects in the testis and sperm of the tropical fish *Gymnotus carapo*. *Tissue and Cell* 47:132–139.

Viarengo, A., Abele-oeschger, D., Burlando, B. (1998). Effects of low temperature on prooxidant processes and antioxidant defence systems in marine organisms. In: Pörtner, H.O., Playle, R.C. (Eds.), *Cold Ocean Physiology*. Cambridge University Press, pp. 212–235.

Vieira, C.E.D., Almeida, M.S., Galindo, B.A., Pereira, L., Martinez, C.B.R. (2014). Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotrop. Ichthyol.* 12, 153–164.

Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Lunardelli, B., Oliveira, L.F., Cabrera, L.C., Risso, W.E., Primel, E.G., Meletti, P.C., Fillmann, G., Martinez, C.B.R. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short term *in situ* exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Sci. Total Environ.* 542, 44–56.

Vilches, C. (2012). Efectos de la contaminación difusa sobre el perifiton de arroyos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP. 179 pp.

Volkoff, H., Canosa, L.F., Unniappan, S., Cerda-Reverter, J.M., Bernier, N.J., Kelly, S.P., Peter, R.E. (2005). Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 3–19.

Volkoff, H., Wyatt, J.L. (2009). Apelin in goldfish (*Carassius auratus*): cloning, distribution and role in appetite regulation. *Peptides* 30, 1434–1440.

von Schiller, D., Acuña, V., Aristia, I., Arroita, M., Basagurena, A., Bellinc, A., Boyero, L., Butturini, A., Ginebreda, A., Kalogianni, E., Larrañaga, A., Majone, B., Martínez, A., Monroy, S., Muñoz, I., Paunović, M., Pereda, O., Petrovic, M., Pozo, J., Rodríguez Mozaz, S., Rivas, D., Sabater, S., Sabater, F., Skoulikidis, N., Solagaistua, L., Vardakash, L., Elosegi, A. (2017). River ecosystem processes: A synthesis of approaches, criteria of use and sensitivity to environmental stressors. *Science of the Total Environment* 596-597, 465-480.

Weber, C. I. (ed.) 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to fresh water and marine organisms. 4th edn. Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory, USEPA, Cincinnati, OH. Report EPA-600/4-90/027F.

Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591 – 625.

WHO (World Health Organization). (1992). Cadmium. Environmental Health Criteria No 1342801.

WHO (World Health Organization) (1993). Biomarkers and risk assessment concepts and principles. Environmental Health Criteria 155. Geneva.

Widdows J., Donkin, P. (1991). Role of physiological energetics in ecotoxicology. *Comp Biochem Physiol C100*: 69-75.

Wright, D.A., Welbourn, P.M. (1994). Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ. Rev.* 2: 187-214.

Wo K.T., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S. (1999). A comparison of growth biomarkers for assessing sublethal effects of cadmium on a marine gastropod, *Nassarius festivus*. *Marine Poll Bull* 39:165–173.

Zambrano M.J, Rautenberg G.E, Bonifacio A.F, Filippi I, Amé M.V, Bonansea R.I, Hueda A.C. (2018). Effects of water quality on aspects of reproductive biology of *Cnesterodon decemmaculatus*. *Science of the Total Environment* 645 10–21.

Zhou B.S. (2001). Bioenergetics and RNA/DNA ratios in the common carp (*Cyprinus carpio*) under hypoxia. *Journal of Comp Physiol B* 171:49–57.