

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

**EFFECTOS DEL TRICLOSAN EN *DANIO RERIO*:
UN ENFOQUE MULTIBIOMARCADOR**

Emanuel Alejandro Sager

Director: Dr. Fernando Román de la Torre
Co-directora: Dra. Andrea Silvana Rossi

Lugar de realización: Grupo de Estudios de Contaminación Antrópica en
Peces (GECAP), Laboratorio de Ecofisiología Aplicada-Instituto Nacional
de Ecología y Desarrollo Sustentable. Universidad Nacional de Luján
(INEDES-CONICET-UNLu)

-2023-

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director, Dr. Fernando de la Torre por darme la posibilidad de desarrollar mi Tesis y por el acompañamiento durante estos años.

Agradecer a mi Co-Directora, Dra. Andrea Rossi, por su acompañamiento y orientaciones para el desarrollo de la Tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

A la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación y CONICET por las Becas otorgadas.

Al Instituto Nacional de Ecología y Desarrollo Sustentable (INEDES) y la Universidad Nacional de Luján, por brindarme las instalaciones y recursos que permitieron la realización de la presente Tesis.

Al Concejero de Estudios, Dr. Andrés Maximiliano Attademo, por las observaciones y sugerencias en los informes de avances.

A la Dra. Paola Scarcia, por ser una excelente compañera de trabajo, por compartir horas de mesada, acuario, papers y algunos mates.

A Anto Santillán, compañera de mesada. Horas y horas procesando muestras que se hacían amenas si eran de a dos.

Al Dr. Damián Marino y Dr. Tomás Mc MacLoughlin que posibilitaron las mediciones analíticas del triclosán, por la ayuda en la redacción de los trabajos y por su paciencia.

Al Instituto de agrobiotecnología y biología molecular (CONICET-INTA-CASTELAR) y a los investigadores: Dra. Gabriela Calamante, Dr. Guido König, Dra. Andrea Peralta, Dra. María Inés Gismondi, Dra. Martina Paoletta, Paula y a Majo, por posibilitarme realizar las mediciones en sus laboratorios, por la dedicación y enseñanza de las técnicas moleculares.

A la Dra. Analía Ale, que me ayudó en la realización de cursos, acompañamiento y lectura de mis trabajos, gracias Ani.

A la Dra. Jimenza Cazenave por su ayuda en la determinación de técnicas bioquímicas.

A la Dra. Fabiana Lo Nostro, por su ayuda en consultas técnicas.

Al Dr. Daniel Silva, por los aportes y asesoramiento en la determinación del compartamiento en peces.

A todo el laboratorio de Ecofisiología Aplicada (PRODEA- INEDES-UNLu): Beti, Martina, Patricia, Fede y Lucre, gracias por su buena predisposición durante estos años y por esos almuerzos "arriba".

A la Dra. Natalia Ossana por los reactivos que me prestabas cuando el laboratorio central cerraba, por los equipos compartidos, las ayudas técnicas y por el aguante de estos años.

A los técnicos del Laboratorio Central de la UNLu: Claudia, Victor, Gustavo, Esteban, Belén y Belu. Gracias por su colaboración constante, sin la cual los equipos y laboratorios no

estarían en condiciones para que podamos hacer el trabajo. Por los pedidos incesantes de reactivos y por su paciencia.

A la Dra. Marina Tagliaferro, por enseñarme a armar un protocolo más o menos digno y por las horas de mesada compartidas.

Al Dr. Ismael Lozano, por ser un gran compañero de laburo, compartir horas de trabajo, ensayos y pesca.

A los amigos becarios del PRODEA: Luis, Belu, Aye, Mauro y Juampi. Por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar, por las horas de catarsis, almuerzos, meriendas (todo lo relacionado con comida) y birras compartidas. No hubiese sido lo mismo sin ustedes. A los amigos de Luján: Laureano, Julián y Tomi, por las horas de laboratorio, las birras, juntadas, pescas y esas eternas horas de charlas filosóficas. A Aldu, por las horas de mesada, de escritura, mates, almuerzos y por las recomendaciones de películas, series y anime.

A Alicia, Euge y Gustavo, amigos del profesorado y la vida. Gracias por el hoppedaje, por ser los "Google maps" en capital, por los asados y vinos compartidos y sobre todo, por el aguante. A Feli, por escuchar siempre con alguna birra de por medio.

A Mecha, Julia, Gonza y Andrea por ayudar en lo que podían siempre. A Leandro, por las enseñanzas de vida y por mostrarme que las puteadas pueden ser terapéuticas.

A Cristina y Laura, que siempre se preocuparon por el "santafesino" del barrio Parque Esperanza. Gracias por las comidas y mates.

A mis amigos de Romang: Juanca, Nico, Eve, Aylén, Kiti, Mayra, Germán, Anto, Lara, Cintia porque si bien nunca podía explicarles bien lo que hacía, aun así me apoyaron y escucharon, gracias siempre.

A las biodiversólogas: Daia, Flor, Pali, Viki, gracias por el aguante todos estos años y por el acompañamiento psicológico.

Tíos Dely y Totín por hospedarme en tantos fines de semana. A Dana y Marcos, por ser la encomienda familiar y acompañarme en Luján. Tío Paco, Lidy y Bibiana por el aguante.

A Tony y Kika, amigos caninos de Romang que se desesperaban cada vez que llegaba a casa.

A mi familia: Sami, Samuel, Gabo, Nenuco, Ma, gracias por el apoyo y aguante de siempre. Neri, por estar siempre prima. Abuela y tios santafesinos, por esperarme con una cerveza fría cada vez que volvía a Santa Fe.

A mi abuela Lidia, por creer siempre en mí y con 94 años preguntar: ¿cuándo vas a terminar?

A Laura, por soportarme y sostenerme en todo este proceso, gracias amor. Siempre agradecido por la persona que sos.

A TODOS, GRACIAS.

Publicaciones originadas a partir de esta Tesis:

- Oxidative stress responses after exposure to Triclosan sublethal concentrations: An integrated biomarker approach using a native (*Corydoras paleatus*) and model fish species (*Danio rerio*). Año 2022. Revista: Journal Toxicology and Environmental Health. Part A: Current Issues. Autores: Sager, Emanuel; Scarcia, Paola; Marino, Damián; MacLoughlin, Tomás; Rossi, Andrea; y de la Torre, Fernando. DOI: <https://doi.org/10.1080/15287394.2021.2007435>
- Multibiomarker responses in *Danio rerio* after exposure to sediment spiked with triclosan. Año 2021. Revista: Anais da Academia Brasileira de Ciencias. Volumen 93 (suplemento 3). Autores: Sager, Emanuel; Rossi, Andrea; MacLoughlin, Tomás; Marino, Damián y de la Torre, Fernando. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201938>

Índice

Agradecimientos.....	1
Publicaciones originadas a partir de esta Tesis.....	3
1. Abreviaturas.....	8
2. Resumen.....	9
2.1 Abstract.....	12
3. Introducción general.....	16
3.1 Contaminantes de preocupación emergente.....	16
3.1.1 Productos de cuidado personal (PCP).....	17
3.2 Triclosán.....	18
3.2.1 Generalidades, aplicaciones y regulación.....	18
3.2.2 Estructura y características fisicoquímicas.....	19
3.2.3 Liberación en el ambiente acuático: principales fuentes y mecanismos de degradación.....	20
3.2.3.1 Concentraciones ambientales en el ambiente acuático.....	23
3.2.4 Efectos tóxicos sobre la biota.....	25
3.2.4.1 Toxicocinética en peces y metabolismo del TCS.....	26
3.3 Biomarcadores de contaminación en peces.....	31
3.3.1 Biotransformación.....	33
3.3.2 Estrés oxidativo.....	34
3.3.3 Neurotoxicidad.....	37
3.4 <i>Danio rerio</i> como organismo modelo.....	38
3.4.1 Reproducción y desarrollo de <i>D. rerio</i>	40
3.4.2 La utilización de <i>D. rerio</i> en ecotoxicología.....	40
3.4.3 Evaluaciones de toxicidad aguda y de efectos subletales en <i>D. rerio</i>	44
3.5 Antecedentes de evaluaciones de toxicidad del TCS con <i>D. rerio</i>	44
3.6 Objetivos.....	46
3.6.1 Objetivo general.....	46
3.6.2 Objetivos específicos.....	46
Capítulo I: Evaluación <i>ex vivo</i> de la toxicidad del triclosán en branquias de organismos adultos de <i>D. rerio</i> .	
4.1 Introducción.....	50
4.2 Materiales y métodos.....	52
4.2.1 Obtención, cría y mantenimiento de los ejemplares de <i>D. rerio</i>	52
4.2.2 Preparación de soluciones de TCS.....	52
4.2.3 Diseño experimental.....	53
4.2.4 Determinación de marcadores de estrés oxidativo y biotransformación.....	54
4.2.5 Análisis estadístico.....	56
4.3 Resultados.....	57
4.4 Discusión.....	59

Capítulo II: Evaluación de la toxicidad del triclosán luego de un periodo corto de exposición en individuos adultos de *D. rerio*.

5.1 Introducción.....	63
5.2 Materiales y métodos.....	65
5.2.1 Diseño Experimental.....	65
5.2.2 Preparación de muestras biológicas.....	67
5.2.3 Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo, daño oxidativo y biotransformación.....	67
5.2.4 Mediciones analíticas del TCS en agua y determinación de parámetros fisicoquímicos.....	68
5.2.5 Análisis estadístico.....	69
5.3 Resultados.....	71
5.3.1 Parámetros fisicoquímicos y concentraciones efectivas de TCS.....	71
5.3.2 Biomarcadores de estrés oxidativo y biotransformación.....	71
5.3.3 Análisis de componentes principales.....	74
5.4 Discusión.....	76

Capítulo III: Evaluación de la toxicidad del triclosán luego de la exposición prolongada en organismos adultos de *D. rerio*.

6.1 Introducción.....	81
6.2 Materiales y métodos.....	88
6.2.1 Diseño experimental.....	88
6.2.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos.....	90
6.2.3 Preparación de muestras biológicas.....	90
6.2.4 Determinación de parámetros biomarcadores.....	90
6.2.4.1 Parámetros morfométricos.....	90
6.2.4.2 Inmunológico: frecuencia leucocitaria.....	90
6.2.4.3 Metabólico: reservas energéticas.....	91
6.2.4.4 Estrés oxidativo, daño oxidativo y biotransformación.....	91
6.2.4.5 Neurotoxicidad: AChE.....	91
6.2.5 Biomarcadores de expresión génica vinculado a respuestas de estrés oxidativo, biotransformación y disrupción endócrina.....	92
6.2.5.1 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo final.....	94
6.2.5.2 Purificación, ligación y transformación de bacterias.....	98
6.2.5.3 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5- α competentes.....	99
6.2.5.4 Estimación de RT-qPCR.....	100
6.2.6 Mediciones analíticas del TCS en agua.....	102
6.2.7 Análisis estadístico.....	102
6.3 Resultados.....	103
6.3.1 Parámetros fisicoquímicos y concentraciones efectivas de TCS.....	103
6.3.2 Parámetros morfométricos.....	103
6.3.3 Biomarcador inmunológico: frecuencia leucocitaria.....	104

6.3.4 Biomarcador metabólico: reservas energéticas.....	104
6.3.5 Biomarcadores de estrés oxidativo, biotransformación y neurotoxicidad.....	105
6.3.6 Biomarcadores de expresión génica vinculado a respuestas de estrés oxidativo, biotransformación y disrupción endócrina.....	109
6.3.7 Análisis de componentes principales de los marcadores bioquímicos de hígado, branquias y cerebro.....	113
6.4 Discusión.....	115
6.4.1 Parámetros morfométricos.....	115
6.4.2 Parámetros de respuesta inmune.....	115
6.4.3 Parámetros de metabolismo energético.....	116
6.4.4 Marcadores bioquímicos y de expresión génica involucrados en respuestas de estrés oxidativo, biotransformación y disrupción endócrina.....	118
6.4.5 Integración de biomarcadores: análisis de componentes principales.....	124

Capítulo IV: Evaluación de la toxicidad en organismos adultos de *D. rerio* expuestos a sedimento enriquecido con triclosán.

7.1 Introducción.....	127
7.2 Materiales y métodos.....	129
7.2.1 Obtención y preparación del sedimento.....	129
7.2.2 Diseño experimental y determinación de parámetros biomarcadores.....	130
7.2.3 Mediciones analíticas del TCS en agua, material en suspensión y sedimento...	132
7.2.4 Análisis estadístico.....	135
7.3 Resultados.....	136
7.3.1 Parámetros de calidad del agua en acuarios y concentración efectiva de TCS y MeTCS.....	136
7.3.2 Parámetros morfométricos.....	137
7.3.3 Biomarcadores de estrés oxidativo, biotransformación y neurotoxicidad.....	138
7.3.4 Integración de marcadores bioquímicos: análisis de componentes principales.....	141
7.4 Discusión.....	143

Capítulo V: Enfoque multibiomarcador de los efectos tóxicos promovidos por el triclosán sobre las respuestas bioquímicas en organismos adultos de *D. rerio*.

8.1 Introducción.....	151
8.2 Materiales y métodos.....	153
8.2.1 Respuestas integradas (IBR) según método de Devin et al. (2014).....	153
8.2.2 Respuestas integradas (IBRv2) según método de Sánchez et al. (2012).....	155
8.3 Resultados.....	157
8.3.1 Análisis de IBR según Devin et al. (2014).....	157
8.3.2 Análisis de gráfico de estrellas e IBRv2 según Sánchez et al. (2012).....	158
8.4 Discusión.....	163

Capítulo VI: Evaluación de la respuesta de escape, recolonización y aislamiento a diferentes concentraciones de triclosán en juveniles de *D. rerio*.

9.1	Introducción.....	168
9.2	Materiales y métodos.....	170
9.2.1	Obtención de organismos juveniles de <i>D. rerio</i>	170
9.2.2	Sistema de exposición multicompartimentado.....	170
9.2.3	Calibración del sistema de escape.....	171
9.2.4	Diseño experimental para la evaluación de escape y preferencia a un gradiente de concentración de TCS.....	173
9.2.4.1	Análisis estadístico.....	173
9.2.5	Diseño experimental para la evaluación de recolonización a un gradiente de concentración de TCS.....	176
9.2.5.1	Análisis estadístico.....	176
9.2.6	Diseño experimental para la evaluación de aislamiento por TCS.....	177
9.2.6.1	Análisis estadístico.....	178
9.3	Resultados.....	179
9.3.1	Validación del sistema con NaCl y distribución de los organismos en ausencia del contaminante.....	179
9.3.2	Evaluación de escape a TCS.....	180
9.3.2.1	Evaluación de preferencia a TCS.....	181
9.3.3	Evaluación de recolonización.....	182
9.3.4	Evaluación de aislamiento al TCS.....	183
9.4	Discusión.....	185

Capítulo VII: Evaluación de la exposición a triclosán en estadios tempranos del desarrollo de *D. rerio*.

10.1	Introducción.....	189
10.2	Materiales y métodos.....	191
10.2.1	Diseño experimental para la determinación de parámetros biomarcadores.....	191
10.2.2	Mediciones analíticas del TCS en agua.....	193
10.2.3	Análisis estadístico.....	193
10.3	Resultados.....	195
10.3.1	Concentraciones efectivas de TCS.....	195
10.3.2	Biomarcadores morfológicos y fisiológico.....	195
10.3.3	Cambios de los niveles basales en los biomarcadores.....	195
10.3.4	Biomarcadores de estrés oxidativo, biotransformación y neurotoxicidad.....	198
10.3.5	Análisis de componentes principales.....	199
10.3.6	Análisis de IBRv2 según Sanchez et al. (2012).....	202
10.4	Discusión.....	204
11	Conclusiones.....	209
12	Bibliografía.....	214

Abreviaturas

- ABAP: 2,2'-azobis (2 metilpropionamida) dihidrocloruro
- AChE: acetilcolinesterasa
- AC50: concentración que produce el 50% del escape de los organismos
- ACAP: capacidad antioxidante total contra radicales peróxidos
- ADNc: ADN copia
- AhR: receptor de hidrocarburos de arilo
- APC: análisis de componentes principales
- ARE: elemento de respuesta a los antioxidantes
- CAT: catalasa
- CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu
- CE: contaminantes de preocupación emergente
- CE50: concentración efectiva 50
- CL50: concentración letal 50
- EPA: agencia de protección ambiental
- ER: receptor de estrógeno
- EROD: etoxiresorufina-Odeetilasa
- FabI: enzima enoil-acil reductasa
- FC: factor de condición
- Fe²⁺: ion ferroso
- FET: Evaluación de Toxicidad en Embriones
- GECAP: Grupo de Estudios de Contaminación Antrópica en Peces
- GPx: glutatión peroxidasa
- GS-DNB: GS-dinitrobenzenu
- GSH: glutatión reducido
- GST: Glutatión-s transferasa
- H₂O₂: peróxido de hidrógeno
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia
- IBR: respuesta integrada de biomarcadores
- IHS: índice hepatosomático
- ISO: Organización Internacional de Normalización
- Kow: coeficiente de partición octanol agua
- L•: radical lipídico
- LOEC: menor concentración que causa un efecto
- LOO•: lipoperoxi-radical
- LOOH: hidroperóxido lipídico
- MeTCS: metiltriclosán
- NOEC: mayor concentración evaluada sin efecto observado
- O₂•-: anión radical superóxido
- OECD: Organización de Cooperación y Desarrollo Económico
- OH•: radical hidroxilo
- PCP: productos de cuidado personal
- PUFA: ácido graso poliinsaturado
- qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- ROS: especies reactivas del oxígeno
- -SO₃⁻: grupo sulfonato
- SOD: superóxido dismutasa
- SULT: sulfotransferasa
- TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
- TCS: triclosán o 5-cloro-2-(2,4diclorofenoxi) fenol
- UGT: Uridina 5'-difosfo-glucuronosil transferasa

2. Resumen

Los contaminantes de preocupación emergente se liberan al ambiente principalmente por fuentes antropogénicas e incluyen una gran diversidad de compuestos como productos de cuidado personal, fármacos, retardantes de llama, solventes y nanopartículas, entre otros. El triclosán (TCS) es un producto de cuidado personal que se utiliza desde 1968 como un antiséptico, desinfectante y conservante en entornos clínicos; así como también en cosméticos, productos de limpieza del hogar y juguetes. Considerando el uso masivo del TCS, su constante incorporación hacia los cuerpos de agua y los posibles efectos sobre las especies acuáticas, la presente Tesis tiene como objetivo general generar nuevos conocimientos que integren procesos biológicos susceptibles de verse afectados por la exposición a TCS en peces. Para ello, se llevaron a cabo ensayos *ex vivo* (con branquias) e *in vivo* con individuos adultos de *Danio rerio* donde se evaluaron múltiples biomarcadores. En el ensayo *ex vivo* (que consistió en la exposición aislada de las branquias) se analizaron los efectos tóxicos a través de biomarcadores de estrés oxidativo y biotransformación. Los tratamientos fueron: solución salina fisiológica (control -Ctrl-), metanol al 0,05% en solución salina (control solvente -CtrlSv-) y dos concentraciones de TCS: 340 y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Luego de 1 h de exposición, las alteraciones más significativas ocurrieron en las branquias expuestas a 340 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS con aumento en la actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST), y disminución en el contenido de glutatión reducido (GSH) y en la capacidad antioxidante total contra radicales peroxilos. Entre los ensayos *in vivo*, se evaluó una batería de biomarcadores en hígado, branquias y cerebro de organismos adultos de *D. rerio* luego de ser expuestos durante 2 días (corto plazo) y 21 días (prolongado) a concentraciones subletales de TCS en agua. Los tratamientos en la exposición a corto

plazo fueron: Control con agua de red no clorada (Ctrl), control solvente con 0,004 % v/v de metanol (CtrlSv,) y dos concentraciones de TCS: 189 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Luego de la exposición a corto plazo, las branquias e hígado fueron los órganos más sensibles a la exposición con TCS, evidenciándose aumento en la actividad de las actividades enzimáticas de GST y superóxido dismutasa (SOD) en branquias, además de daño oxidativo de lípidos en hígado. Respecto a la prolongada, los tratamientos fueron: Ctrl, CtrlSv y dos concentraciones de TCS: 60 y 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Luego de 21 días de exposición, se observó una disminución en la frecuencia de linfocitos y un aumento en el número de neutrófilos, así como una disminución en el contenido de lípidos en hígado de los peces. Asimismo, si bien se activaron las respuestas antioxidantes mediadas por las enzimas catalasa (CAT) y SOD en hígado, no fueron suficientes para evitar el daño oxidativo en lípidos. También se observó la sobre expresión génica en hígado de peces evidenciando respuestas a nivel transcripcional frente al estrés oxidativo (*nrf2* y *gst pi*) y de biotransformación de fase I (*cyp1a*). En las branquias, se observaron aumentos de las actividades de GST y SOD, las cuales no fueron suficientes para evitar el daño oxidativo en lípidos. En el cerebro, la exposición a TCS ocasionó neurotoxicidad mediada por la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE). Por otra parte, se evaluó el efecto a corto y largo plazo (2 y 21 días) de la exposición al sedimento enriquecido con TCS sobre la respuesta de biomarcadores en hígado, branquias y cerebro en ejemplares adultos de *D. rerio*. Los tratamientos fueron: sedimento sin fortificar y sedimento fortificado con TCS. Los peces permanecieron en contacto con sedimento sin fortificar (Ctrl) y sedimento fortificado con TCS que bajo las condiciones ensayadas fue biotransformado principalmente a metiltriclosán. Las branquias fueron el órgano más

sensible luego de 2 días de exposición, evidenciado por aumento de daño oxidativo en lípidos y aumento de la actividad de SOD; mientras que luego de 21 días, el hígado fue el órgano más sensible, mostrando una menor capacidad antioxidante total contra radicales peroxilos, daño oxidativo en lípidos y aumentos de las actividades de SOD y CAT. Los resultados de los biomarcadores obtenidos en los bioensayos con organismos adultos se integraron con el fin de obtener una respuesta holística de los efectos del TCS sobre los peces. Se utilizaron dos métodos para el cálculo de la respuesta integrada de biomarcadores (IBR) y se observó que el método propuesto por Sánchez et al. (2012) aportó mayor información respecto a la toxicidad del TCS. En general, hígado fue el órgano que presentó los mayores valores de IBR y el daño oxidativo en lípidos (expresado como cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico -TBARS-) fue el biomarcador más sensible y significativo. Por otra parte, se evaluó la capacidad de escape, recolonización y aislamiento a distintas concentraciones de TCS en organismos juveniles de *D. rerio*. Se empleó un sistema de exposición estático multicompartimentado no forzado y de libre elección. La evaluación de escape y recolonización se evaluó registrando la distribución de los organismos expuestos en el sistema ar un gradiente de concentraciones de TCS (400, 200, 100, 50 y 2 $\mu\text{g L}^{-1}$); mientras que para la evaluación de aislamiento se utilizó una concentración de 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Luego de 2 h de observación de la distribución de los peces, se evidenció que fueron capaces de detectar y evitar ambientes contaminados con TCS, incluso ante concentraciones subletales. Asimismo, se verificó que la presencia del tóxico impidió la recolonización de los hábitats y actuó como barrera química. Por último, se determinaron biomarcadores en estadios tempranos del desarrollo de *D. rerio* luego de

la exposición a concentraciones subletales de TCS. Para ello, los embriones (<6 h de vida) se expusieron durante 48, 72, 96 y 168 h a tres concentraciones de TCS: 25, 47 y 86 $\mu\text{g L}^{-1}$. El TCS promovió efectos neurotóxicos a través de la inhibición de AChE luego de 72, 96 y 168 h de exposición. Además, la exposición a 87 $\mu\text{g L}^{-1}$ promovió respuestas antioxidantes que no fueron suficientes para contrarrestar el daño oxidativo en lípidos en organismos expuestos durante 72, 96 y 168 h. El análisis integrado de los biomarcadores evidenció que las larvas expuestas durante 96 h fueron las más sensibles a la exposición con TCS. Las evaluaciones ecotoxicológicas desarrolladas en la presente Tesis aportaron un mayor conocimiento de la toxicidad del TCS en una especie modelo como *D. rerio* sobre parámetros no evaluados hasta el momento. Asimismo, se integraron aspectos biológicos importantes para el pez en todos sus niveles de desarrollo (larvas, juveniles y adultos) y sus poblaciones, demostrando que el TCS provoca una disminución en el bienestar de los peces alterando su equilibrio oxidante-antioxidante, expresión génica y daño en biomoléculas importantes como los lípidos, así como alteraciones comportamentales. Debido al gran uso y liberación creciente de TCS a los ambientes de agua dulce, la información generada en esta tesis representa un valioso aporte para aplicar en medidas de regulación y control ambiental.

2.1 Abstract

Pollutants of emerging concern are released into the environment primarily from anthropogenic sources and include a wide variety of compounds such as personal care products, pharmaceuticals, flame retardants, solvents, and nanoparticles (among others). Triclosan (TCS) is a personal care product that has been used since 1968 as an antiseptic, disinfectant, and preservative in clinical settings, as well as in cosmetics, household cleaning products, and toys. Considering the massive use of TCS, its constant

incorporation into bodies of water, and its possible effects on aquatic species, the general objective of this Thesis is to generate new knowledge that integrates key biological processes which may be affected by exposure to TCS in fish. For this purpose, an *ex vivo* test (with gills) and *in vivo* tests were carried out with adult individuals of *Danio rerio* and multiple biomarkers were evaluated. In the *ex vivo* assay (carried out through the exposure of the gills), the toxic effects were analyzed through oxidative stress and biotransformation biomarkers. The treatments were: physiological saline solution (control, Ctrl), 0.05% methanol in saline solution (solvent control, CtrlSv) and two concentrations of TCS: 340 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of TCS. After 1 h of exposure, the most significant alterations occurred in gills exposed to 340 $\mu\text{g L}^{-1}$ of TCS with increased glutathione S-transferase (GST) enzymatic activity, and decreased reduced glutathione content (GSH) and in the total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP). Among the *in vivo* assays, a battery of biomarkers was evaluated in the blood, liver, gills, and brain of adult *D. rerio* organisms after being exposed for 2 days (short term) and 21 days (long term) to sublethal concentrations of TCS in water. The treatments in short-term exposure were: control with non-chlorinated tap water (Ctrl), solvent control with 0.004 % v/v methanol (CtrlSv,) and two concentrations of TCS: 189 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. After short-term exposure, the gills and liver were the most sensitive organs to TCS exposure, evidencing increased GST and superoxide dismutase (SOD) activities in gills and oxidative damage in the liver. In prolonged exposure, the treatments were: Ctrl, CtrlSv, and two concentrations of TCS: 60 and 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ of TCS. After 21 days of exposure, a decrease in the frequency of lymphocytes and an increase in the number of neutrophils was observed, as well as a decrease in the lipid content in the liver of the fish. Likewise,

although the antioxidant responses mediated by catalase (CAT) and SOD enzymes were activated in the liver, they were not sufficient to prevent lipid oxidative damage. Gene overexpression was also observed in liver the liver of fish, evidencing responses at the transcriptional level against oxidative stress (*nrf2* and *gst pi*) and phase I biotransformation (*cyp1a*). In gills, increases in the activities of GST and SOD were observed, which were not enough to prevent lipid oxidative damage. In the brain of fish, the exposure to TCS caused neurotoxicity mediated by inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity. On the other hand, the short- and long-term (2 and 21 days) effects of the TCS-enriched sediment on the response of biomarkers in liver, gills, and brain in adult organisms of *D. rerio* were evaluated. The treatments were: sediment without fortification and sediment fortified with TCS. After exposure during both periods, most of the TCS was biotransformed to methyltriclosan. The gills were the most sensitive organ after 2 days of exposure, showing lipid oxidative damage and increased SOD activity; while after 21 days of exposure, the liver was the most sensitive organ showing lower total antioxidant capacity against free radicals peroxy, lipid oxidative damage and increased SOD and CAT activities. The results of the biomarkers obtained in the bioassays with adult organisms were integrated to obtain a holistic response of the effects of TCS on fish. Two methods were used to calculate the integrated biomarker response (IBR) and it was observed that the method proposed by Sánchez et al. (2012) provided more information regarding the toxicity of TCS in bioassays with *D. rerio*. Overall, the liver was the organ that presented the highest IBR values and the oxidative damage in lipidos (through the quantification of thiobarbituric acid reactive species - TBARS-) was the most sensitive and significant biomarker. On the other hand, the

avoidance, recolonization, and isolation capacity at different concentrations of TCS *D. rerio* juvenile were evaluated. A non-forced exposure multi-compartment system was used. The escape and recolonization evaluation consisted of a TCS concentration gradient of 400,200,100,50 and 2 $\mu\text{g L}^{-1}$; while for the evaluation of isolation a concentration of 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ of TCS was employed. After two hours of observing the distribution of the fish, it was evidenced that they were capable of detecting and avoiding environments contaminated with TCS, even at sublethal concentrations. Likewise, it was verified that the presence of the toxic substance prevented the fish from recolonization of the habitats and acted as a chemical barrier. Finally, biomarkers were determined at the early stages of *D. rerio* development after exposure to sublethal concentrations of TCS. For this purpose, embryos (> 6 h of life) were exposed for 48, 72, 96 and 168 h to three concentrations of TCS: 25, 47 and 86 $\mu\text{g L}^{-1}$. TCS promoted neurotoxic effects through AchE inhibition after 72, 96, and 168 h of exposure. The integrated analysis of the biomarkers showed that the larvae exposed for 96 h were the most. The ecotoxicological evaluations developed in this thesis provided a greater knowledge of the toxicity of TCS in a model species such as *D. rerio*, on parameters not up-to-date evaluated. Likewise, important biological aspects for all the stages of fish development (embryos, juveniles, and adults) and their populations were integrated, demonstrating that TCS causes a decrease in the organisms' welfare by altering their oxidant-antioxidant balance, gene expression and damage to important biomolecules like lipids, as well as behavioral alterations. Due to the great use and increasing release of TCS to freshwater environments, the information generated in this Thesis represents a valuable contribution for environmental regulation and control purposes.

3. Introducción general

El aumento de la población mundial y la intensificación de la industrialización sin precedentes generaron un gran incremento de la producción y utilización de una gran variedad de sustancias químicas, así como cambios físicos en el ambiente, dando origen a la problemática de la contaminación ambiental. En este sentido, un contaminante es cualquier agente físico, químico (de origen natural o sintético) o biológico, que es introducido por el hombre, cuyos niveles se consideran superiores a los que normalmente se encontrarían en el ambiente (Walker et al. 2012). Para la mayoría de los productos químicos orgánicos hechos por el hombre, cualquier nivel detectable es anormal porque los compuestos no se encontrarían en el ambiente de no ser por las actividades que los liberaran (Walker et al. 2012).

Muchos de los contaminantes químicos sintéticos son liberados al ambiente a través de desechos industriales y municipales que tienen como último destino los ambientes acuáticos. En este sentido, existe una constante preocupación por efectos que dichos contaminantes puedan generar sobre los ecosistemas y los suministros de agua potable y de superficie (Kumar et al. 2021; Pal et al. 2010). En este contexto, la ecotoxicología acuática surge como una disciplina científica que tiene como objetivo comprender y predecir la distribución, destino y efectos causados por agentes contaminantes de diferente naturaleza que, a causa de la acción antrópica, son introducidos o alcanzan niveles anormales en el ambiente (Carriquiriborde 2021).

3.1 Contaminantes de preocupación emergente

El avance científico y las nuevas tecnologías de los últimos 30 años posibilitaron una mayor sensibilidad en las detecciones de sustancias contaminantes en el ambiente, así

como la determinación de otras que no habían sido identificadas hasta el momento. En este contexto, surgen los contaminantes de preocupación emergente (CE); definidos como nuevos compuestos químicos o biológicos sin estatus regulatorio, donde su impacto en el ambiente y salud humana son poco conocidos (Montes-Grajales et al. 2017; Yadav et al. 2021). Los CE se liberan principalmente por fuentes antropogénicas e incluyen una gran diversidad de compuestos como productos de cuidado personal (PCP), fármacos, retardantes de llama y solventes, nanopartículas, microplásticos, entre otros (Liu y Wong 2013). Debido a su amplia utilización en hogares e industrias, los CE son introducidos al ambiente de manera continua, por lo que no requieren una vida media prolongada para ejercer daño en el ambiente ya que sus altas tasas de transformación/remoción pueden ser compensadas (Gil et al. 2012; Montes-Grajales et al. 2017).

3.1.1 Productos de cuidado personal (PCP)

Los PCP comprenden diversas sustancias domésticas que se utilizan cuyas aplicaciones abarcan la salud, belleza y limpieza. Estos incluyen desinfectantes, fragancias, repelentes de insectos, conservantes y filtros UV, entre otros (Montes-Grajales et al. 2017). Algunos se consideran CE debido a su presencia e impacto negativo en los ecosistemas acuáticos (Montes-Grajales et al. 2017). La entrada de dichos productos químicos a los cuerpos de agua se produce principalmente a través de los efluentes de aguas residuales debido a su eliminación incompleta o ineficiente. La gran cantidad de PCP y su diversidad en estructuras químicas y toxicología plantean un desafío significativo para comprender el impacto ambiental y sanitario adverso de estos productos en organismos acuáticos (Hontela y Habibi, 2013).

3.2 Triclosán

3.2.1 Generalidades, aplicaciones y regulación

El triclosán (TCS), o 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol, es un PCP antibacteriano fenólico halogenado no iónico de amplio espectro, conocido también con otros nombres comerciales como: Irgasan DP300, Microban y Biofresh (Bedoux et al. 2012). El TCS se utiliza en productos desde 1968 como un antiséptico, desinfectante y conservante en entornos clínicos; así como en cosméticos, productos de limpieza del hogar e incluso en juguetes. Asimismo, también se ha incorporado en la superficie de dispositivos médicos, materiales plásticos, textiles y utensilios de cocina. En este sentido, en países de Asia, Europa y América del Norte se ha utilizado como ingrediente de jabones, detergentes, pasta dental, enjuague bucal, desodorante, champú, entre otros innumerables productos (Dann y Hontela, 2011). En este sentido, ya a comienzos del siglo XXI la mayoría de los 700 productos antibacterianos disponibles para los consumidores contenían TCS como ingrediente activo (Hontela y Habibi, 2013).

El TCS es bacteriostático incluso a bajas concentraciones, dado que inhibe la biosíntesis de ácidos grasos a través de la inhibición de la enzima enoil-acil reductasa (FabI) que es clave para la división celular de numerosas bacterias gramnegativas y grampositivas (Heath et al. 1999; McMurry et al. 1998). Por otro lado, a concentraciones mayores, el TCS induce la fuga de K^+ celular, lo que genera desestabilización de membranas y a un rápido efecto bactericida (Gomez- Escalada et al. 2005).

El uso del TCS no fue regulado inicialmente debido a que se consideraba que poseía una baja toxicidad aguda para los mamíferos y era considerado “seguro” para humanos (Rodricks et al. 2010). Por esta razón, durante varias décadas, los fabricantes han

incorporado TCS a sus fórmulas con el objetivo de brindar una protección antibacteriana duradera (Yueh y Tukey 2016), por lo que, como consecuencia, permitió que éste ingrese al ambiente acuático. Sin embargo, en la última década, diferentes agencias internacionales han cuestionado el uso del TCS debido a que se han probado interacciones tóxicas en tejidos vivos (Dar et al. 2022). En este sentido, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) han aplicado regulaciones al uso del TCS. En el 2016 se impuso una prohibición sobre el uso de TCS en jabones (Mahalak et al. 2020; Weatherly y Gosse, 2017). Asimismo, en el 2017 la Comisión Europea detuvo el uso de TCS en productos destinados a la higiene general y reguló su concentración como conservante en algunos cosméticos y enjuagues bucales. Sin embargo, el TCS todavía está permitido en muchos PCP como pastas de dientes, enjuagues bucales y desinfectantes para manos (Dar et al. 2022). Particularmente, en Argentina el uso del TCS en los PCP se encuentra regulado desde el año 2016 por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, la cual permite una concentración máxima de 0,3% ($m v^{-1}$). En América Latina no existen regulaciones oficiales, leyes ambientales o listas de vigilancia sobre CE como el TCS en matrices ambientales (Reichert et al. 2019).

3.2.2 Estructura y características fisicoquímicas

El TCS tiene una estructura similar a los bifenilos policlorados (Figura 1), éteres difenílicos polibromados, bisfenol A, dioxinas y hormonas tiroideas (Hontela y Habibi 2013).

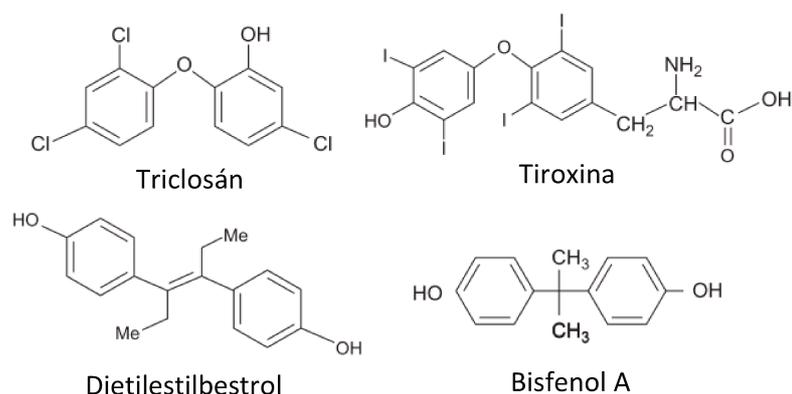


Figura 1. Estructura química del TCS y compuestos similares.
 Extraído de Hontela y Habibi (2013).

La fórmula molecular es $C_{12}H_7Cl_3O_2$ (número de registro CAS 3380-34-5, peso molecular $289,55 \text{ mol g}^{-1}$), térmicamente estable, con un punto de ebullición entre 280 y 290 °C, y punto de fusión entre 54 y 57 °C. El TCS presenta una baja solubilidad en agua (12 mg L^{-1} ; Reiss et al. 2002). Sin embargo, es mucho más soluble en etanol y en grasas, con un alto coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow} = 3,5-4,8$ a pH neutro; Halden y Paull 2005) y altos coeficientes orgánicos de partición carbono-agua $\log K_{oc}$ 3:8 4:0 (Lindström *et al.* 2002). En el medio acuático se presenta en forma ionizada con una vida media en agua superficial de aproximadamente 41 min (Lyndall et al. 2010; Reiss *et al.* 2002).

3.2.3 Liberación al ambiente acuático: principales fuentes y mecanismos de degradación

La mayor parte del TCS se elimina en las plantas de tratamiento de aguas residuales locales donde sufre procesos de biodegradación y sorción, lo que hace que diferentes concentraciones lleguen al agua superficial a través de los efluentes. En la Figura. 2 se muestra el ciclo de vida del TCS en el ambiente acuático. Debido a que el TCS es un

compuesto lipofílico, dentro de los hábitats acuáticos puede acumularse en los sedimentos.

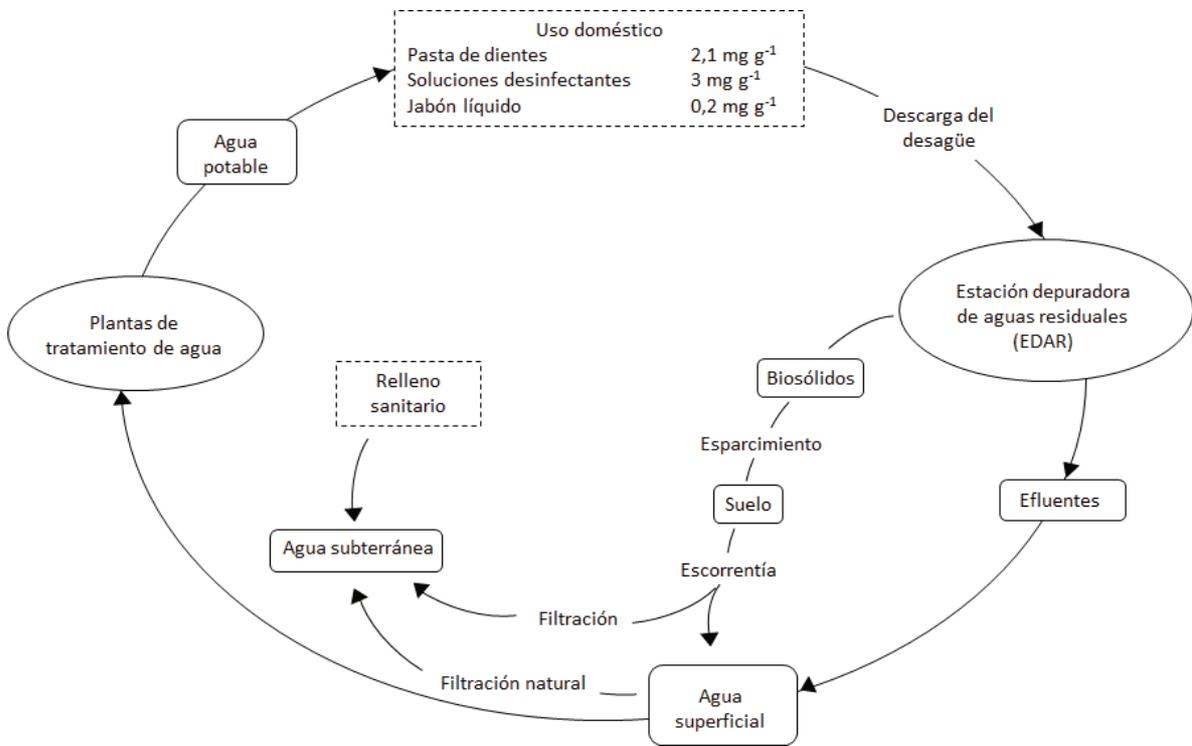


Figura 2. Ciclo de vida del TCS en ambientes acuáticos. Figura modificada de Bedoux et al. (2012).

Ciertos factores físicos y químicos como el pH, salinidad, la presencia de iones metálicos y/o ácidos húmicos y las condiciones de irradiación (longitud de onda UV o luz solar) tienen una gran influencia en la degradación del TCS (Bedoux et al. 2012). Su degradación puede deberse a: tratamientos químicos (cloración y ozonólisis), sonólisis, biodegradación y fotodegradación (oxidación fotocatalítica y fotólisis); y cada tipo produce metabolitos diferentes. El tratamiento químico es el que presenta la mayor cinética de degradación (2 min, pH 7) (Canosa et al. 2005; Fiss et al. 2007) seguidas por la sonólisis (3-110 min, pH 7-8) (Sanchez-Prado *et al.* 2008), la oxidación fotocatalítica (15 min a 1 día) (Yu et al. 2006), la fotólisis (2,7 min a 8 días, pH 7,0-8,0) y por último, la biodegradación (4 a 60 días) (DeLorenzo et al. 2008). El proceso de biodegradación ha

sido utilizado en las plantas de tratamientos de aguas residuales, donde el TCS es degradado en condiciones aeróbicas o anaeróbicas con una tasa de eliminación superior al 90% (Bester 2003; McAvoy et al. 2002). En este sentido, Singer et al. (2002) demostraron que alrededor del 79% de la disminución de TCS se debe a la degradación aeróbica o anaeróbica, mientras que el 15% restante se le atribuyó a la sorción en los sedimentos activados. El conocimiento acerca de microorganismos responsables de la biodegradación del TCS en aguas residuales es limitado, pero se ha investigado acerca de bacterias y hongos capaces de inactivarlo (Hay et al. 2001; Roh et al. 2009). En este contexto, durante el proceso de tratamiento de aguas residuales, el TCS puede convertirse en otros derivados o metabolitos que poseen mayor persistencia debido a su lipofilia y resistencia a la biodegradación.

A partir de la degradación del TCS, se pueden generar subproductos o metabolitos, los cuales se agrupan en 5 categorías según el proceso aplicado y las condiciones fisicoquímicas del medio (Figura 3). En primer lugar, debido a la cloración del TCS se pueden generar productos como el tetraclosan y pentaclosan, los cuales pueden, a su vez, generar dioxinas (segunda categoría). Las dioxinas, son más estables y perjudiciales en el ambiente que sus precursores (Bedoux et al. 2012). En tercer lugar, debido al proceso de fotodegradación, también se pueden generar dioxinas y otros compuestos como hidroquinona y quinona triclosán. En la cuarta categoría están los derivados de clorofenol y el cloroformo, los cuales se generan durante la cloración y fotólisis, generando por ejemplo 2, 4 diclorofenol. Por último, se encuentra el derivado lipofílico de TCS, el metiltriclosán (MeTCS) que se produce mediante la metilación (Balmer et al. 2004; Lindström et al. 2002). Este compuesto se encuentra en condiciones de

biodegradación (Chen et al. 2009; Wu et al. 2009; Xu et al. 2009). Aunque el MeTCS es generalmente menos frecuente en el ambiente que el TCS, su mecanismo de acción es similar y puede encontrar en los ambientes a niveles mensurables incluso cuando el TCS está por debajo del límite de detección (Lindström et al. 2002). Asimismo, en las plantas de aguas residuales, la inactivación del TCS en el sedimento es promotora de la formación de MeTCS. El proceso de formación de MeTCS a partir de TCS es de particular interés debido a que el primero tiene la tendencia a resistir la fotodegradación en un pH de agua superficial y posee mayor potencial de bioacumulación (DeLorenzo y Fleming 2008; Lindström et al. 2002).

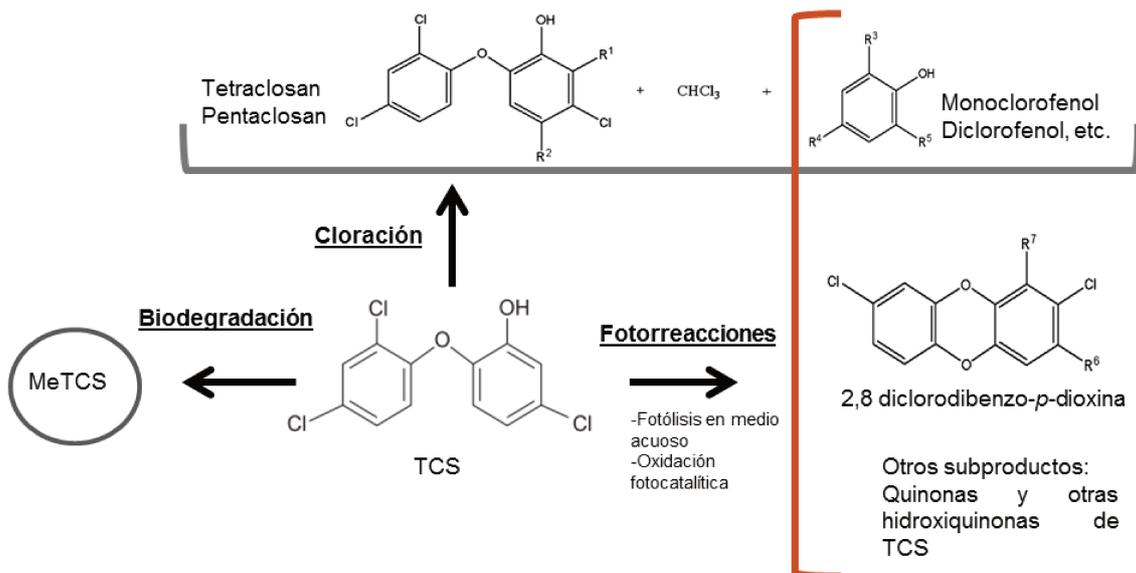


Figura 3. Mecanismos de degradación del TCS. Se muestran algunos de los subproductos o metabolitos más importantes generados por biodegradación, cloración y fotorreacciones. MeTCS: metiltriclosan. Figura modificada de Bedoux et al. (2012).

3.2.3.1 Concentraciones ambientales en el ambiente acuático

La amplia utilización del TCS en los PCP coincide con una gran cantidad de evidencia de su bioacumulación y persistencia en el ambiente (Hontela y Habibi 2013). Hasta el 96% del TCS en los productos de consumo terminan en los desagües, dando como resultado

una concentración de TCS que varía de 1 a 10 mg L⁻¹ en afluentes de las plantas de tratamiento (McAvoy et al. 2002).

El TCS es un contaminante común en los compartimentos sólidos y líquido, y se ha detectado en niveles desde nanogramos hasta varios microgramos por kilogramo en sedimentos de ríos, lagos e incluso de fuentes de agua potable (McAvoy et al. 2002). De hecho, el TCS se encuentra entre los siete compuestos más frecuentemente detectados en ríos de Estados Unidos (Singer et al. 2002), por lo que su presencia en los ecosistemas acuáticos es significativa. Dependiendo de la operación de las plantas de tratamientos, una amplia gama de concentraciones de TCS se puede liberar al ambiente y llegara las aguas receptoras. A nivel mundial, los valores esperados de TCS en agua dulce superficiales se encuentran en el orden de 2,2 a 5370 ng L⁻¹ (Kumar et al. 2021), donde los países que presentan mayores niveles son India, Canadá, China, España y Australia. Un estudio en el que se midieron las concentraciones de TCS en efluentes de aguas residuales de Estados Unidos (Reiss et al. 2002) informó que las mismas oscilaban entre 200 y 2700 ng L⁻¹. Asimismo, en ríos de Suramérica se encontraron valores entre 66 y 415 ng L⁻¹ de TCS en efluentes de aguas residuales de Brasil (Vélez et al. 2019) y entre 260 y 290 ng L⁻¹ de TCS en efluentes de aguas residuales de Colombia (Martínez y Peñuela 2013).

En sedimento de estuarios de Estados Unidos, se midieron concentraciones de TCS entre 9 y 348 µg kg⁻¹ (Walsh et al. 2017), mientras que Pusceddu et al. (2018) hallaron 15 µg kg⁻¹ de TCS en la costa de Brasil. En sedimentos de ríos de España, se han encontrado de hasta 38 µg kg⁻¹ de TCS (Canosa et al. 2005) y 53 µg kg⁻¹ de TCS en ríos de Suiza (Singer et al. 2002). Asimismo, se han establecido los niveles guía permitidos para cuerpos de

agua dulce en países como Canadá, con un valor máximo de $0,47 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS (ECCC, 2018). En Argentina, si bien existen límites establecidos para la utilización del TCS en los PCP, aún no se han determinado sus concentraciones ambientales y tampoco se han establecido los niveles máximos permitidos de este compuesto en aguas superficiales y sedimentos de los ambientes acuáticos.

3.2.4 Efectos tóxicos sobre la biota

Si bien el TCS no había sido considerado tóxico para los mamíferos (Rodricks et al. 2010), un número creciente de estudios demostraron que su exposición produce numerosos efectos sobre diferentes tipos organismos en relación con la alteración de la homeostasis hormonal, el metabolismo de los lípidos, la inducción de apoptosis, inflamación o inclusive carcinogénesis (Fair et al. 2009; Lee et al. 2014; Ruszkiewicz et al. 2017; Yueh et al. 2014).

En la Figura 4 se muestran los principales efectos promovidos por el TCS sobre la biota. En este contexto, se ha estudiado la toxicidad del TCS utilizando varios tipos de especies acuáticas ambientalmente sensibles, como microalgas (Bi et al. 2018; Coogan et al. 2007; Orvos et al. 2002; Pan et al. 2018) invertebrados (Dussault et al. 2008; Pusceddu et al. 2018), anfibios (Falfushynska et al. 2017; Palenske et al. 2010) y peces (Ishibashi et al. 2004; Oliveira et al. 2009; Fu et al. 2019; Wang et al. 2020). Los estudios realizados hasta el momento han utilizado un amplio rango de concentraciones efectivas de TCS. Las especies de algas son las más vulnerables al TCS, con una CE50 de 96 h de $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ y una concentración sin efectos observados (NOEC) de 96 h de $0,69 \mu\text{g L}^{-1}$ (Orvos et al. 2002). La NOEC para peces está en el rango de $34\text{-}200 \mu\text{g L}^{-1}$ (Orvos et al. 2002; Ishibashi et al. 2004; Capdevielle et al. 2008). Asimismo, los estudios en renacuajos han

evidenciado que TCS actúa como disruptor endócrino. Veldhoen et al. (2006) examinaron los efectos de TCS sobre el desarrollo de larvas de anfibios de la rana toro norteamericana (*Rana catesbeiana*), y probaron que el TCS interrumpió la acción mediada por la hormona tiroidea en el contexto de la metamorfosis en los renacuajos.

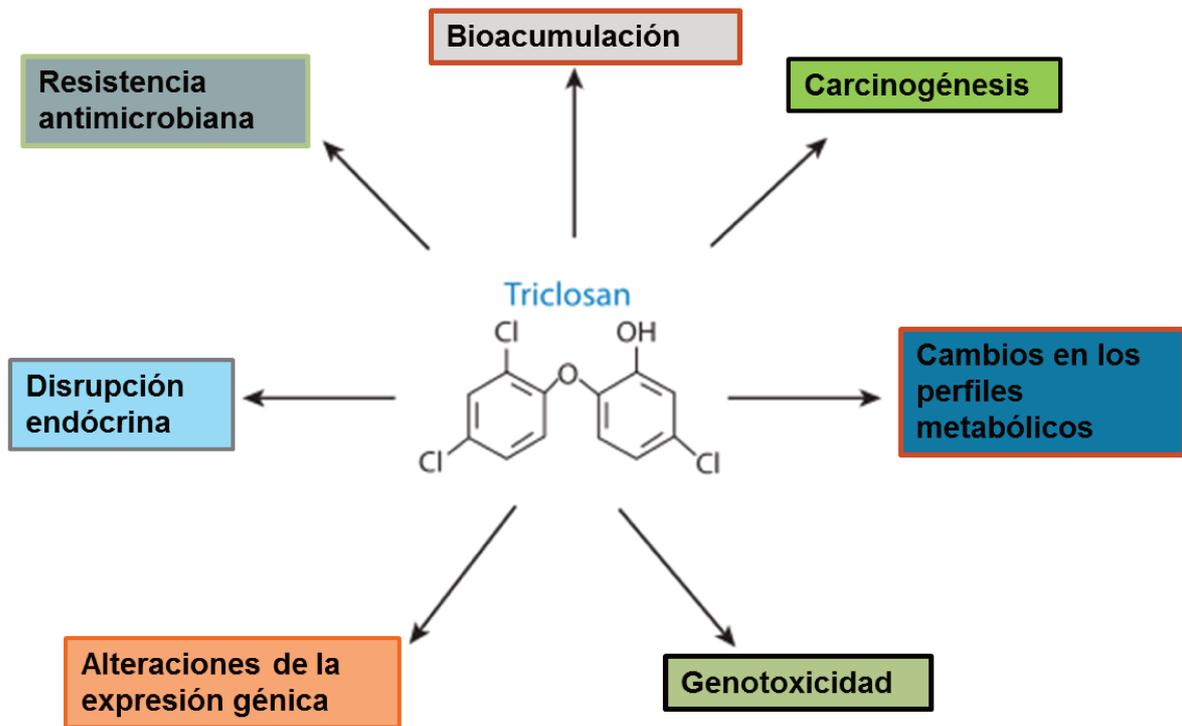


Figura 4. Efectos promovidos por el TCS sobre la biota. Figura modificada de Yueh y Tukey (2016) y Kumar et al. (2021).

3.2.4.1 Toxicocinética en peces y metabolismo del TCS

Los peces constituyen el grupo más diverso de vertebrados, con una gran variedad en su morfología, fisiología y hábitos. Poseen un papel importante en los ecosistemas acuáticos a través de la transferencia de energía en las redes tróficas, así como por la gran diversidad de nichos ecológicos que ocupan (Di Giulio y Hinton 2008; Scarcia 2013). Debido a su diversidad de especies y hábitats, los peces han sido utilizados en numerosas investigaciones, específicamente sobre las influencias de las variables ambientales en la evolución, la genética y las adaptaciones de los organismos. En términos de

contaminación, en la actualidad, los peces constituyen el mayor grupo de vertebrados utilizados para estudios ecotoxicológicos (Di Giulio y Hinton 2008).

Por otra parte, el comportamiento de los contaminantes en el ambiente depende no sólo de las características físicas y químicas de los compuestos (densidad, solubilidad, polaridad, etc.), sino también de las características del medio (temperatura, pH, tipo de suelo, permeabilidad, tamaño de partículas, contenido de humedad y de materia orgánica, entre otros). Una constante de gran utilidad para determinar el destino de los contaminantes es el Kow que indica la lipofilidad y que para contaminantes orgánicos neutros permite estimar su capacidad de bioacumularse. Sustancias con valores de partición Kow entre 5 y 6 suelen considerarse bioacumulables. Aquellos contaminantes hidrofóbicos, liposolubles y con Kow altos, podrán atravesar libremente las membranas biológicas en favor del gradiente de concentración por difusión simple, sin costo energético alguno. Dicha capacidad se irá reduciendo a medida que aumente su polaridad, o sea, se trate de sustancias más hidrofílicas, hidrosolubles y con Kow bajos, y aumente el tamaño de la molécula (Carrquiriborde, 2021).

En los peces, la absorción de contaminantes se produce principalmente a través de las branquias, la piel y el intestino, donde las células están diseñadas para una absorción rápida y eficiente. Los contaminantes atraviesan las membranas utilizando varios mecanismos que incluyen la difusión pasiva simple, la difusión facilitada, la filtración a través de canales de membrana, el transporte activo y la endocitosis (Tierney et al., 2013). En particular, las características anatómicas y fisiológicas de las branquias de los peces que favorecen el intercambio eficaz de gases respiratorios también contribuyen a la captación de compuestos directamente del agua. Las branquias son órganos que

poseen finas membranas que separan la sangre y el agua, con una gran superficie y elevadas tasas de flujo de sangre (perfusión) y agua (ventilación) a contracorriente. Además, constituyen un órgano multifuncional (respiración, ion-regulación, regulación ácido-base, excreción de desechos) y son particularmente sensible a los contaminantes ambientales debido a que se encuentran en contacto directo con el medio (Ale et al. 2018).

Tras ser incorporado a través de alguna de las vías de exposición mencionadas previamente, un contaminante puede pasar al sistema circulatorio y ser redistribuido (traslocado) a diferentes partes del cuerpo. Aunque la distribución de las sustancias químicas al principio de una exposición suele estar determinada por el flujo sanguíneo relativo de los tejidos, muchas sustancias químicas se redistribuyen con el tiempo de acuerdo con su afinidad por los componentes de los tejidos. Por ejemplo, los tejidos con mayor contenido de lípidos pueden actuar como depósitos de almacenamiento de compuestos lipofílicos (Di Giulio & Hinton, 2008; Tierney et al., 2013).

La acumulación de sustancias químicas puede reducirse sustancialmente mediante la biotransformación (ver sección 3.3.1) para finalmente ser eliminados por diferentes vías y mecanismos dependiendo del compuesto. Los principales sitios de eliminación en los peces son el sistema hepatobiliar (eliminación fecal), los riñones (renal) y las branquias (branquial) (Tierney et al. 2013).

El hígado de los peces desempeña un rol clave en la síntesis, metabolismo y distribución de nutrientes y metabolitos secundarios; en la biotransformación de compuestos lipofílicos (incluidas las sustancias como los PCP) y en la formación y excreción de la bilis. La gran capacidad para metabolizar hace que sea un órgano blanco de contaminantes,

así como de defensa de los mismos. El deterioro de la estructura y funciones hepáticas alteran el correcto funcionamiento de otros órganos y el organismo (Di Giulio y Hinton 2008).

Por otra parte, el cerebro de los peces posee diversas funciones vitales para el mantenimiento del equilibrio metabólico, ya que, por ejemplo, coordina el comportamiento y las actividades de los demás sistemas de órganos y permite responde a estímulos externos (Basu, 2015). Debido a su complejidad y diversas funciones, el cerebro es un órgano clave para evaluación de alteraciones en el sistema nervioso en presencia de sustancias tóxicas. En este sentido, está separado del resto del cuerpo por una capa de células unidas estrechamente, denominada barrera hematoencefálica, la cual impide que diferentes productos químicos ingresen al cerebro, lo que resulta en una protección del mismo. Sin embargo, algunos químicos (neuroactivos) pueden ingresar y promover alteraciones en su estructura y funciones (Carriquiriborde 2021).

El metabolismo del TCS en animales no depende de la vía de administración (Sandborgh-Englund et al. 2006), sin embargo, la eliminación del TCS del cuerpo varía de una especie a otra y también depende de la dosis/concentración y parámetros ambientales (Kumar et al. 2021). En la Figura 5 se resume el metabolismo del TCS en los peces, que se da en dos fases (ver sección 3.3.1). Durante la fase I, el proceso de hidroxilación aumenta la polaridad de la molécula de TCS y establece el camino para el metabolismo de la fase II. En este contexto, durante la Fase II el TCS puede sufrir 2 mecanismos: el de sulfatación y el de glucuronidación (Wang et al. 2004). La forma de sulfato es catalizada por la enzima sulfotransferasa (SULT), que transfiere un grupo sulfonato ($-SO^3$) al TCS (Paul et al. 2019). La reacción de glucuronidación también es una reacción de conjugación, entre

el ácido UDP-glucurónico y el TCS para formar el glucurónido de TCS conjugado, la reacción es catalizada por la enzima Uridina 5'-difosfo-glucuronosil transferasa (UGT). Estas reacciones de conjugación dan como resultado la inhibición de los ionóforos de protones en TCS y los hacen polares e hidrofílicos. Asimismo, luego de la metilación, el TCS puede sufrir el proceso de glucosilación. El hígado se considera el órgano principal o central para la detoxificación del TCS y puede ser metabolizado por la enzima CYP1A1 del complejo citocromo P450 de la Fase I (Li et al. 2013; Weatherly y Gosse, 2017). Finalmente, la eliminación del TCS del cuerpo animal varía según la especie, concentración y parámetros ambientales (Kumar et al. 2021).

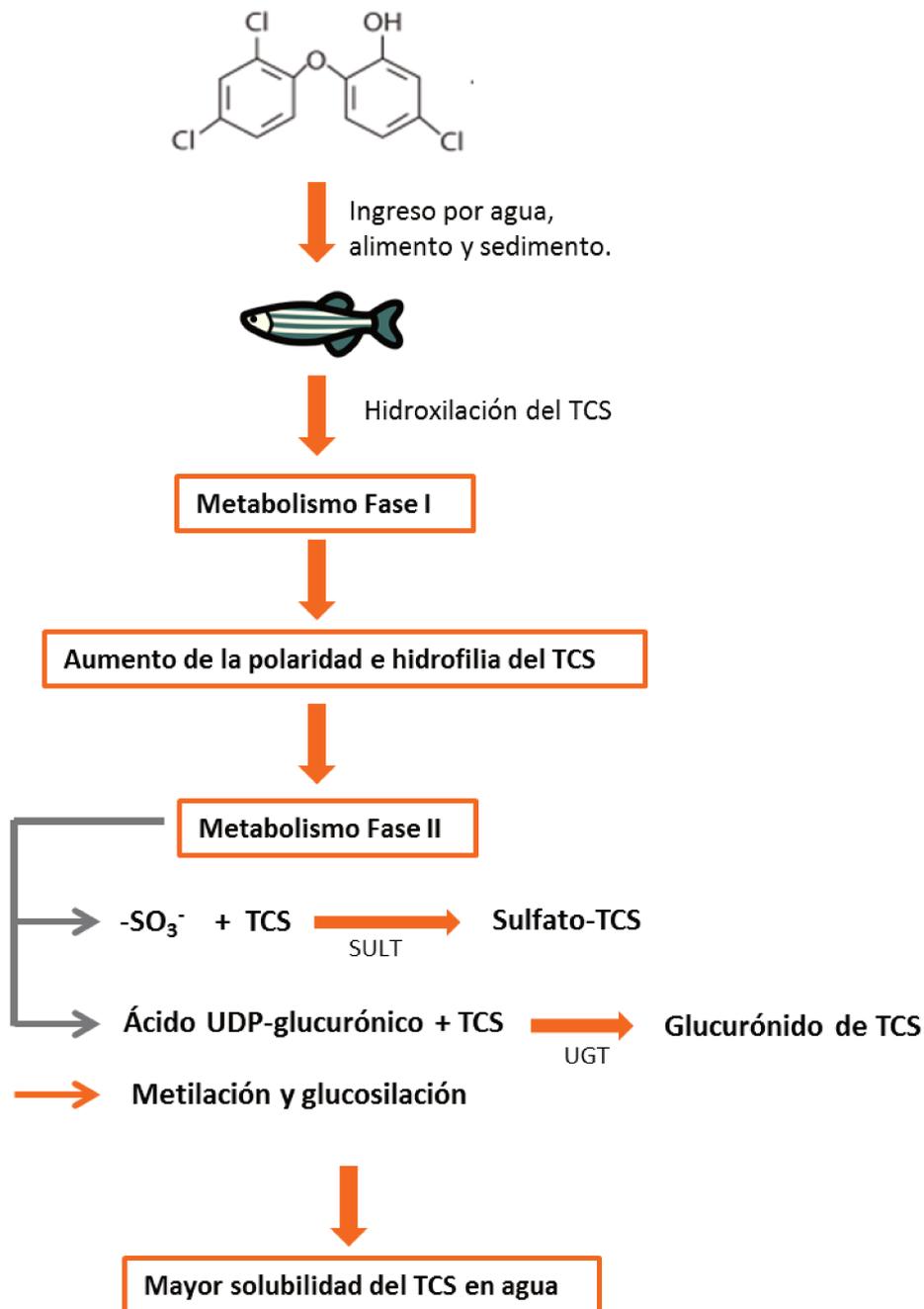


Figura 5. Metabolismo del TCS en peces. Figura modificada de Kumar et al. (2021).

3.3 Biomarcadores de contaminación en peces

Los peces pueden estar expuestos a contaminantes sin aparentes señales de efectos adversos provocados por los mismos. Sin embargo, existen estimaciones que permiten detectar y evaluar la exposición o daño de un contaminante. En ecotoxicología, los biomarcadores se definen como cambios en una respuesta biológica (fisiológicas,

bioquímicas, histológicas y comportamentales) que puede relacionarse con la exposición o los efectos tóxicos de contaminantes ambientales (Peakall, 1994). En este sentido, constituyen una herramienta de evaluación de efectos tóxicos muy útil en los estudios de evaluación de riesgo ambiental. La importancia de su uso reside en la capacidad para proveer un sistema de alerta temprana, a nivel de organismo o sub-organismo, antes de que ocurran cambios a niveles de organización mayores (población, comunidad, ecosistema) (Walker et al. 2012). Existen diversas clasificaciones de biomarcadores, siendo la más aceptada la que los clasifica en tres: biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad (WHO 1993; van der Oost et al. 2003).

Un biomarcador de exposición se puede utilizar para confirmar y evaluar la exposición de individuos o poblaciones a un compuesto en particular, relacionando los niveles de exposición externa y los niveles internos (WHO 1993). Los biomarcadores de efecto abarcan las alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de otro tipo, que se puedan detectar y medir dentro de los tejidos o fluidos corporales de un organismo, para vincularse de esta manera con una enfermedad o deterioro de la salud (WHO 1993). Por otro lado, los biomarcadores de susceptibilidad indican la capacidad inherente o adquirida de un organismo (factores genéticos y cambios en los receptores que alteran la susceptibilidad de un organismo a esa exposición), para responder frente a la exposición de una sustancia específica (WHO 1993).

La medición de un biomarcador único no es suficiente y debe complementarse con una batería de biomarcadores (Iturburu et al. 2018). En este sentido, una batería de biomarcadores bioquímicos y fisiológicos es utilizada frecuentemente para detectar o diagnosticar efectos subletales en peces expuestos a un contaminante (van der Oost et al. 2003). Por lo dicho anteriormente, los biomarcadores representan una herramienta

importante en ecotoxicología de ambientes acuáticos, ya que constituyen indicadores sensibles de alteraciones, por lo que pueden ser utilizados en estrategias diagnósticas y preventivas (Rojo 2021).

3.3.1 Biotransformación

Luego de que un contaminante orgánico no polar ha ingresado en un organismo puede biotransformarse en compuestos polares, más solubles que se excreten rápidamente. Sin embargo, este proceso de biotransformación también puede cambiar la actividad biológica del compuesto y con ello, su destino y actividad, potenciando su toxicidad y disminuyendo la excreción del compuesto (Timbrell y Marrs, 2009).

La biotransformación de compuestos se realiza en dos fases, en las cuales se encuentran implicadas una gran variedad de reacciones. La fase I está catalizada por el grupo de enzimas del complejo P450 como por ejemplo la CYP1A1, CYP1A2 y CYP2D6 (Uno et al. 2012; Wu et al. 2017), las cuales están asociadas con el retículo endoplásmico liso (oxigenasas, enzimas que eliminan el oxígeno reducido, enzimas hidrolíticas). Si los metabolitos de las reacciones de fase I son suficientemente solubles en agua, pueden excretarse fácilmente en este punto.

Los metabolitos del sistema de fase I son sustrato de las enzimas del sistema de biotransformación de fase II. Dicha fase involucra la conjugación bioquímica, en la cual ciertas enzimas unen pequeñas moléculas como el glutatión reducido (GSH), la glicina y otros aminoácidos al contaminante. En las vías de la fase II, la conjugación de GSH por la enzima glutatión-s transferasa (GST) es una de las principales vías de defensa. Finalmente, los productos de la fase II en ocasiones son solubles en agua, fácilmente excretables y habitualmente carecen de actividad farmacológica y toxicidad para el organismo (Burkina et al. 2015). El TCS en los peces, es biotransformado en la fase II (ver

sección 3.2.4.1) a través de la sulfonación y/o glucuronidación, y, por lo tanto, estos conjugados forman el principal producto de transformación del TCS (Arnot et al. 2017). Las enzimas de biotransformación de fase I y II son usualmente empleadas como biomarcadores, aunque no siempre son específicas, ya que son sensibles a múltiples contaminantes y factores como la edad y el órgano blanco (Glisic et al. 2015).

3.3.2 Estrés oxidativo

En todos los organismos aeróbicos, más del 90% del O_2 consumido se reduce a H_2O a través de la cadena respiratoria y menos del 10% restante del O_2 sufre una reducción parcial generando especies reactivas del oxígeno (ROS) (Lushchak 2015). Las ROS más comunes son el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) así como también metabolitos electrofílicos. A bajas concentraciones, las ROS cumplen funciones celulares y fisiológicas esenciales, pero al acumularse pueden reaccionar con macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN, así como alterar las vías de señalización redox de los procesos apoptóticos y de división celular (Rand 1995; Jones 2006). Para contrarrestar el efecto deletéreo de las ROS, las células cuentan con mecanismos antioxidantes para su eliminación, lo que significa que la cantidad de ROS producidos es prácticamente igual a la eliminada (Lushchak 2011). Sin embargo, cuando la concentración de ROS aumenta por encima de la concentración de equilibrio o bien el sistema de defensas antioxidante no es suficiente para contrarrestar la generación de ROS, se genera el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es una situación en la que la concentración de ROS aumenta de forma transitoria o crónica, perturbando el metabolismo celular y su regulación y dañando los componentes celulares (Lushchak 2011).

Entre las defensas antioxidantes se las puede clasificar por su naturaleza enzimática y no enzimática. De las defensas enzimáticas más importantes se pueden incluir las llevadas a cabo por la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT). La SOD, cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ formando oxígeno y H_2O_2 el cual es en sí mismo una ROS que puede ser removido por la actividad de otra de las enzimas antioxidantes como la CAT que lo reduce a oxígeno y agua. Por su parte, determinados efectos bioquímicos y fisiológicos han sido asociados con el incremento de ROS, pudiendo ser buenos indicadores de estrés oxidativo. Respecto a las defensas antioxidantes no enzimáticas, el GSH juega un rol crítico en la protección celular, así como en el metabolismo y detoxificación de compuestos tóxicos y es considerado como la primera línea de defensa celular, previniendo la acción tóxica de las ROS. La interacción que existe entre los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos es compleja y varias de estas son termodinámicamente posibles (Figura 6).

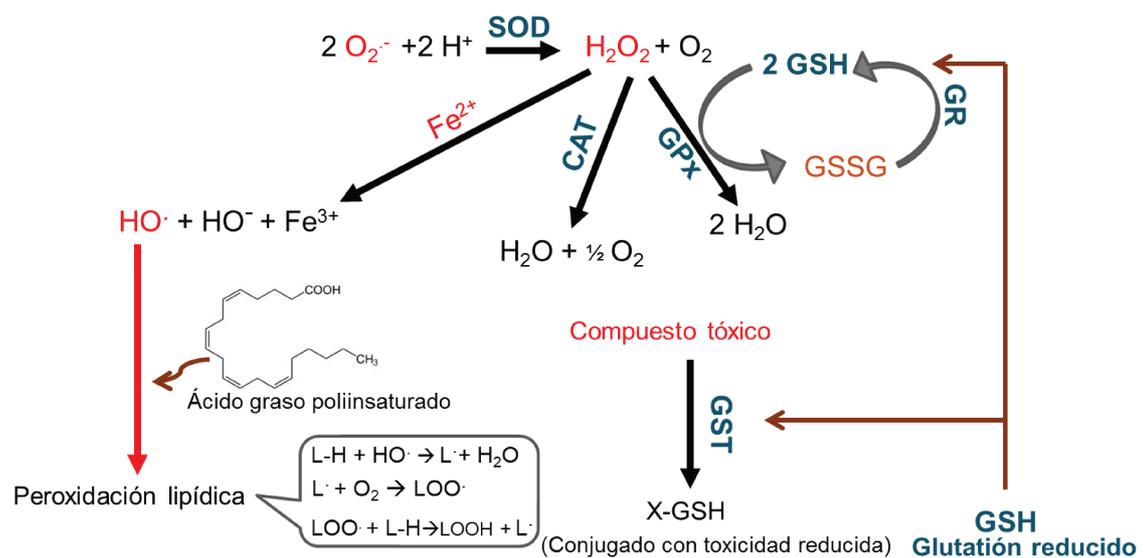


Figura 6. Esquema que resume las principales defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. GSSG: glutatión oxidado; GR: glutatión reductasa. GPx: glutatión peroxidasa. Figura modificada de Monserrat (2021).

La importancia de mantener los niveles intracelulares de H_2O_2 radica en que esta molécula, en presencia de hierro libre (Fe^{2+}) genera la especie más reactiva, el radical hidroxil ($HO\bullet$). Este radical puede remover un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado (PUFA), promoviendo el proceso de peroxidación lipídica, una de las variables comúnmente utilizadas para caracterizar daño oxidativo. En dicho proceso (Figura 6) un PUFA (L-H) en presencia de $HO\bullet$ genera un radical lipídico ($L\bullet$) que, en un ambiente aeróbico, genera un lipoperoxi-radical ($LOO\bullet$) el cual perpetúa el proceso de peroxidación lipídica por medio de la remoción de otro átomo de hidrógeno de otra molécula de PUFA para generar un hidroperóxido lipídico (LOOH). El LOOH es una molécula estable que comúnmente es utilizada para evaluar daño oxidativo en lípidos, por ejemplo, a través de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

En diversos organismos, incluidos los peces, la producción de ROS puede ser incrementada por la exposición a una gran cantidad de contaminantes de diferente naturaleza, como metales, plaguicidas, hidrocarburos poliaromáticos, PCP, entre otros. En este sentido, las defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) son ampliamente utilizadas como biomarcadores debido a su sensibilidad alta, así como por la variedad de contaminantes capaces de generar el efecto de estrés oxidativo. Además, la estimación global de la capacidad antioxidante donde estén incluidas las defensas enzimáticas y no enzimáticas contra una determinada especie reactiva, es una herramienta importante para la evaluación de la capacidad antioxidante en las células luego de la exposición a un contaminante (Monserat 2021; Regoli y Winston 1998). En este sentido, la estimación de la capacidad antioxidante total contra radicales peroxilos

(ACAP) ha sido utilizada como biomarcador en peces (Amado et al. 2009; Ale et al. 2018; Santillán Deiu et al. 2021).

3.3.3 Neurotoxicidad

El sistema nervioso de los vertebrados es sensible a los efectos tóxicos de los compuestos orgánicos, los cuales pueden alterar la transmisión normal del impulso nervioso a lo largo de los nervios y/o a través de la sinapsis entre terminaciones nerviosas y células musculares (Walker et al. 2012). Los receptores de acetilcolina que se encuentran en las membranas postsinápticas representan los sitios de acción de diversos compuestos orgánicos como los organofosforados y neonicotinoides.

La liberación de acetilcolina ocurre desde las terminaciones de los nervios colinérgicos, y la acetilcolina funciona como un mensajero químico. Cuando un impulso llega a una terminación nerviosa, se libera acetilcolina y transporta la señal a través de la hendidura sináptica hasta un receptor en la membrana postsináptica de una célula nerviosa, muscular o glandular, de modo que se transmite el impulso (mensaje). Para un control neuronal efectivo, es esencial que esta señal termine rápidamente y para lograrlo, la acetilcolina debe ser descompuesta rápidamente por la una enzima llamada acetilcolinesterasa (AChE). La inhibición de la AChE tiene el efecto de reducir o prevenir por completo la descomposición de la acetilcolina. En consecuencia, la acetilcolina se acumula en las sinapsis, lo que provoca una sobre estimulación del receptor y la producción continua de una señal después de que debería haberse detenido. Si esta situación continúa, el sistema de señales finalmente se agotará, lo que provocará un bloqueo sináptico y la acetilcolina no podrá transmitir señales a través de la sinapsis. En

el caso de uniones neuromusculares así afectadas los músculos podrían no contraerse o relajarse en respuesta a la estimulación nerviosa (Walker et al. 2012).

La inhibición de AChE ha sido utilizada para evaluar la toxicidad de compuestos orgánicos específicos como los organofosforados, sin embargo, en los últimos años se ha generado evidencia de que otros tóxicos, como por ejemplo plaguicidas y detergentes exhiben actividad anticolinesterásica (de la Torre et al. 2005; Cazenave et al. 2021). Por lo tanto, debido al alcance limitado de las evaluaciones de neurotoxicidad promovidas por los PCP, resulta necesario considerar los posibles efectos anticolinesterásicos durante el desarrollo y en cerebro de los peces expuestos a TCS.

3.4 *Danio rerio* como organismo modelo

Danio rerio (“zebrafish” o pez cebra) es un pez de agua dulce, originario de Oriente Medio (India, Pakistán y Nepal), perteneciente a la Familia Cyprinidae (Figura 7). Habita cuerpos de agua poco profundas, lénticos o con escasa corriente y de fondos limosos, con abundante vegetación (Reed y Jennings 2011). Tiene una alimentación omnívora (plancton, insectos y plantas), la cual obtienen de toda la columna de agua y sustratos. La esperanza de vida media en su ambiente natural es de 1 o 2 años, mientras que en condiciones de laboratorio es de 3 años y medio (Reed y Jennings 2011).



Figura 7. Clasificación taxonómica y principales estadios de vida de *D. rerio*. Figura modificada de Oliveira, 2009.

En organismos reproductivamente maduros, la diferencia entre los sexos se puede observar a simple vista, donde las hembras tienen mayor abdomen debido al desarrollo de óvulos, mientras que los machos son más delgados y oscuros que las hembras (Reed and Jennings 2011). Los organismos adultos no superan los 5 cm de largo y 1,5 gramos. Estos peces poseen fecundación externa sin cuidado parental.

Existen características que hacen a *D. rerio* una adecuada especie modelo: es un vertebrado de tamaño pequeño, que soporta altas densidades con un ciclo de vida corto y desarrollo embrionario externo, rápido y sincronizado, así como embriones y larvas transparentes. Es de fácil mantenimiento y se reproduce de manera exitosa en condiciones controladas de laboratorio. Además, tiene una gran similitud en la estructura celular, los procesos de señalización y la fisiología con otros vertebrados como los seres humanos (Oliveira 2009; Reed and Jennings 2011). Por lo dicho, ésta especie ha sido utilizada por la comunidad científica desde la década de 1960, siendo en la actualidad una especie modelo para estudios concernientes a la biología del desarrollo y evolutiva, toxicología, teratología, neurobiología, genética, entre otras. Asimismo, la secuenciación completa de su genoma permitió una amplia gama de aplicaciones en biología genética y molecular avanzada.

3.4.1 Reproducción y desarrollo de *D. rerio*

La clasificación de las diferentes etapas embrionales de *D. rerio* fueron descritas por Kimmel et al. (1995) y desde entonces se ha utilizado para los estudios ecotoxicológicos (Parichy et al. 2009). En la presente Tesis se siguió la clasificación de Kimmel et al. (1995) para la clasificación del desarrollo embrionario y ciclo de vida descrito por Reed y Jenning 2011. En la Figura 7 se muestran los principales estadios de *D. rerio*. Desde 0 a

72 horas post fecundación (hpf) se denominan embriones. Luego de las 72 hpf hasta el día 13 post fecundación (dpf) se encuentra el primer estadio larval. Al periodo que comprende de 0 a 7 dpf se lo denomina genéricamente como estadios tempranos del desarrollo (Falisse et al. 2017; Boulanger et al. 2019) y de 14 dpf hasta 29 dpf se llaman larvas medias. A los 30 dpf hasta los 3 o 4 meses corresponde a la etapa de juveniles y luego, con la madurez sexual, los peces se convierten en adultos.

3.4.2 La utilización de *D. rerio* en ecotoxicología

Danio rerio se ha utilizado como especie centinela en estudios ecotoxicológicos en todo el mundo (Jin et al. 2010; Oliveira 2009; Padilla 2014). Debido a su importancia como organismo modelo en el estudio de la contaminación acuática, se han desarrollado numerosos protocolos para la utilización de esta especie en evaluaciones ecotoxicológicas. En la Tabla 1 se muestran algunos criterios de evaluación ecotoxicológica utilizados con *D. rerio*, realizados por la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico y la Organización Internacional de Normalización (OECD e ISO por sus siglas en inglés, respectivamente). A partir de la década de 1990, los protocolos estaban orientados a la evaluación de la toxicidad aguda, crecimiento y los efectos a corto plazo en las primeras etapas de vida de *D. rerio* (Oliveira 2009). En la última década se realizaron numerosos cambios de los protocolos iniciales, que permitieron mejorar los criterios de valoración de la toxicidad de los compuestos. Entre dichas modificaciones se incluyen la implementación de la Evaluación de Toxicidad en Embriones (FET por sus siglas en inglés), donde se encuentran estandarizadas las condiciones para bioensayos en la evaluación de contaminantes sobre embriones de los peces (OECD, 2006; 2013). Si bien el periodo embrionario culmina con la eclosión de las larvas (Kimmel et al. 1995),

el FET permite la exposición de las mismas hasta un máximo de siete días post fecundación.

El FET surge como una alternativa a nivel internacional (ISO 15088-2007) para la determinación de la toxicidad de las sustancias y ha sido modificado por la OECD (2013) para *D. rerio*. En la actualidad, la comunidad científica utiliza el protocolo FET OECD 236, para la evaluación de la ecotoxicidad de muchas sustancias. El mismo, permite el seguimiento de una amplia gama de puntos finales, no sólo efectos letales sino también de efectos subletales que proporcionan más información sobre el modo de acción de las sustancias y sus posibles riesgos ecológicos. De esta forma, los efectos se pueden observar, por ejemplo, a través de los latidos del corazón, la pigmentación o el desarrollo de los ojos, entre otros (OECD, 2013).

Tabla 1. Criterios de evaluación toxicológica con *D. rerio* como organismo modelo.

Criterios	Descripción	Referencia
Ensayo de toxicidad aguda con organismos adultos.	Los peces se exponen a una sustancia de prueba durante 96 horas y las mortalidades se registran a las 24, 48, 72 y 96 horas. Se determinan las concentraciones que matan al 50% de los peces (CL50).	OECD 203 (1992)
Prueba de toxicidad a corto plazo en peces en etapa de embrión y larvas.	Los embriones se exponen a una sustancia, en condiciones de flujo continuo o semiestáticas. Se colocan los huevos fertilizados en las cámaras de prueba y continúa al menos hasta que todos los peces de control se alimentan libremente. Los efectos letales y subletales se evalúan y comparan con los valores de control para determinar la concentración más baja con efecto observado (LOEC) y, por lo tanto, las concentraciones sin efecto observado (NOEC).	OECD 212 (1998)
Determinación de la toxicidad letal aguda.	Especifica un método estático para la determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias únicas estables, no volátiles, solubles en agua en condiciones específicas.	ISO 7346 (1996)
Determinación de la toxicidad aguda de las aguas residuales para los huevos de pez cebra	Método para la determinación de los grados de dilución o concentraciones como una medida del efecto tóxico agudo de las aguas residuales en los huevos de peces dentro de las 48 h. También es aplicable a aguas residuales municipales tratadas y efluentes industriales.	ISO 15088 (2007)

Criterios	Descripción	Referencia
Toxicidad en embriones.	Se evalúa la exposición de los huevos recién fecundados durante un máximo de 48 horas. Se utilizan como indicadores de letalidad la coagulación de los huevos fertilizados, falta de formación de somitas, falta de desprendimiento de la yema de la cola del saco vitelino, falta de latidos del corazón. Los efectos letales se determinan por comparación con los controles para identificar los valores de CL50, NOEC y LOEC. Evaluaciones subletales.	OECD 236 (2013)
Evaluación con dos generaciones de peces.	Se evalúan la capacidad de fecundación (número de huevos) como la viabilidad del embrión producida por organismos adultos expuestos a un contaminante en particular. Posteriormente, la viabilidad de los embriones resultantes de la F1 (es decir, éxito de eclosión, tasa de desarrollo, aparición de malformaciones, etc.) se evalúa en animales mantenidos en las mismas condiciones a las que estuvieron expuestos los adultos.	OECD 212 (2008)
Ensayos con peces durante 21 días.	Exposición con organismos adultos durante 21 días, con el objetivo de la actividad estrogénica y androgénica e inhibición de la aromatasa.	OECD 230 (2009)

3.4.3 Evaluaciones de toxicidad aguda y de efectos subletales en *D. rerio*

Los datos de toxicidad aguda son esenciales para la evaluación de riesgos ambientales y la clasificación de nuevas sustancias (Braunbeck et al. 2005). El objetivo de estos ensayos es identificar una concentración que cause el 50% de la mortalidad de los organismos expuestos. La mortalidad se evalúa a las 96 horas y se pueden evaluar otros parámetros como la LOEC y NOEC. *D. rerio* ha sido ampliamente utilizado en pruebas de toxicidad aguda para estudiar la ecotoxicidad de solventes (Turner et al. 2012), metales (Chen et al. 2021), productos farmacéuticos (Ni et al. 2019) y pesticidas (Wang et al. 2017).

Sin embargo, las evaluaciones de toxicidad aguda en peces solo proporcionan datos letales sin considerar los efectos subletales de los contaminantes. En este contexto, se han desarrollado metodologías que permiten determinar efectos subletales en organismos expuestos a concentraciones más bajas de los contaminantes, enfatizando la identificación de modos de acción más específicos de los contaminantes (Braunbeck et al. 2005). Con organismos adultos de *D. rerio* se han desarrollado varias herramientas para la evaluación de la contaminación en muestras ambientales, identificación de daños en el ADN, evaluación de la expresión génica, alteraciones de la actividad enzimática, efectos teratogénicos, morfológicas e histopatológicas, entre otros.

Por lo tanto, la implementación de criterios o puntos finales de evaluación de efectos subletales a corto y largo plazo de exposición más allá de los establecidos en los principales protocolos (Tabla 1), añade un valor significativo a las evaluaciones ecotoxicológicas que consideran los efectos de un contaminante sobre peces como *D. rerio*.

3.5 Antecedentes de evaluaciones de toxicidad del TCS con *D. rerio*

En las últimas décadas se han desarrollado investigaciones que evaluaron los efectos del TCS sobre *D. rerio* focalizadas principalmente en estadios tempranos del desarrollo. Se demostró que la exposición a TCS en embriones y larvas de los peces promueve daños cardiovasculares (Ma et al. 2019a; Saley et al. 2016; Wang et al. 2020), alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos y de aminoácidos (Fu y Bae 2020; Fu et al. 2019; Sheng et al. 2021); así como efectos negativos sobre la capacidad de forrajeo (Wirt et al. 2018). Asimismo, se demostró que el TCS promovía un inadecuado desarrollo de células hepáticas, musculares y neuronales (Kim et al. 2018; Liu et al. 2019; Ma et al. 2019b) y desregulación de la expresión de genes vinculados al metabolismo energético (Fu et al. 2020), neurotoxicidad y disrupción endócrina (Huang et al. 2020; Wang et al. 2019).

Los estudios que contemplan las evaluaciones ecotoxicológicas con organismos adultos de *D. rerio* han sido abordadas en menor medida (Tatarazako et al. 2004; Oliveira et al. 2009; Liu et al. 2018; Gyimah et al. 2020), las cuales se han centrado en evaluar los efectos del TCS sobre disrupción endócrina, algunos marcadores bioquímicos y parámetros comportamentales. Sin embargo, los estudios que integran una batería de marcadores bioquímicos, génicos, energéticos, comportamentales e inmunológicos luego de la exposición a TCS en diferentes estadios de vida de *D. rerio*, así como en distintas matrices ambientales han sido escasamente abordados. En este sentido, aún son incipientes los trabajos que contemplan los efectos del TCS sobre diversos órganos que permitan una evaluación orgánica más global en los peces. El uso de una batería de biomarcadores y su evaluación en múltiples órganos permite complementar la información generada y comprender de manera holística cómo responde un organismo a un estresor.

3.6. Objetivos

3.6.1 Objetivo General

Considerando el uso masivo del TCS, su constante incorporación hacia los cuerpos de agua y los efectos sobre las especies acuáticas; la presente Tesis tiene como objetivo general, generar nuevos conocimientos que integren procesos biológicos claves en peces, susceptibles de verse afectados por la exposición a TCS.

3.6.2 Objetivos específicos

En función del objetivo general, se desprenden los siguientes objetivos específicos que se abordarán en los diferentes capítulos:

1. Evaluar en un sistema *ex vivo* la toxicidad del triclosán en branquias de organismos adultos de *D. rerio*.
2. Evaluar los efectos de la exposición a corto plazo a soluciones de triclosán sobre parámetros asociados a procesos de biotransformación y de estrés oxidativo en organismos adultos de *D. rerio*.
3. Estudiar los efectos de la exposición prolongada a soluciones de triclosán sobre parámetros asociados a procesos de biotransformación, de estrés oxidativo, de respuesta inmune y metabolismo energético en organismos adultos de *D. rerio*, así como evaluar la expresión de los genes vinculados con respuestas a estrés oxidativo (*nrf2*, *gstpi*), biotransformación (*cyp1a*) y disrupción endócrina (*cyp19b*).
4. Evaluar el impacto de la exposición al sedimento enriquecido con triclosán sobre las respuestas de diferentes biomarcadores de *D. rerio* luego de la exposición a un periodo corto y prolongado.

5. Estudiar la respuesta de escape, colonización y aislamiento en organismos juveniles de *D. rerio* en sistemas de exposición no forzada con diferentes concentraciones de triclosán.
6. Estudiar el efecto de la exposición a triclosán en estadios tempranos del desarrollo de *D. rerio* sobre biomarcadores morfológicos, de estrés oxidativo y neurotoxicidad.
7. Obtener un enfoque integrado de las respuestas biológicas de los efectos tóxicos sobre los marcadores bioquímicos promovidos por el triclosán.

En el presente trabajo, se evaluaron múltiples biomarcadores que aportaron nuevos conocimientos sobre la toxicidad del TCS ya que se consideraron condiciones no estimadas hasta el momento. En primer lugar, con el fin de obtener una referencia inicial para las posteriores evaluaciones *in vivo*, se determinaron marcadores bioquímicos luego de la exposición *ex vivo* de un órgano *target* (branquias) tratado con soluciones de TCS (capítulo I). A continuación, se evaluaron una batería de biomarcadores en hígado, branquias y cerebro de organismos adultos de *D. rerio* luego de exposiciones subletales de TCS en agua (capítulo II y III) y sedimento enriquecido con TCS (capítulo IV). Los resultados de los biomarcadores obtenidos en los bioensayos con organismos adultos de *D. rerio* se integraron con el fin de obtener una respuesta holística de los efectos del TCS sobre los peces (capítulo V). Por otra parte, se evaluaron la capacidad de escape, colonización y aislamiento a distintas concentraciones de TCS con organismos juveniles de *D. rerio* (capítulo VI). Finalmente, se determinaron los marcadores bioquímicos en estadios tempranos del desarrollo de *D. rerio* luego de la exposición a concentraciones subletales de TCS (capítulo VII) (Figura 8).

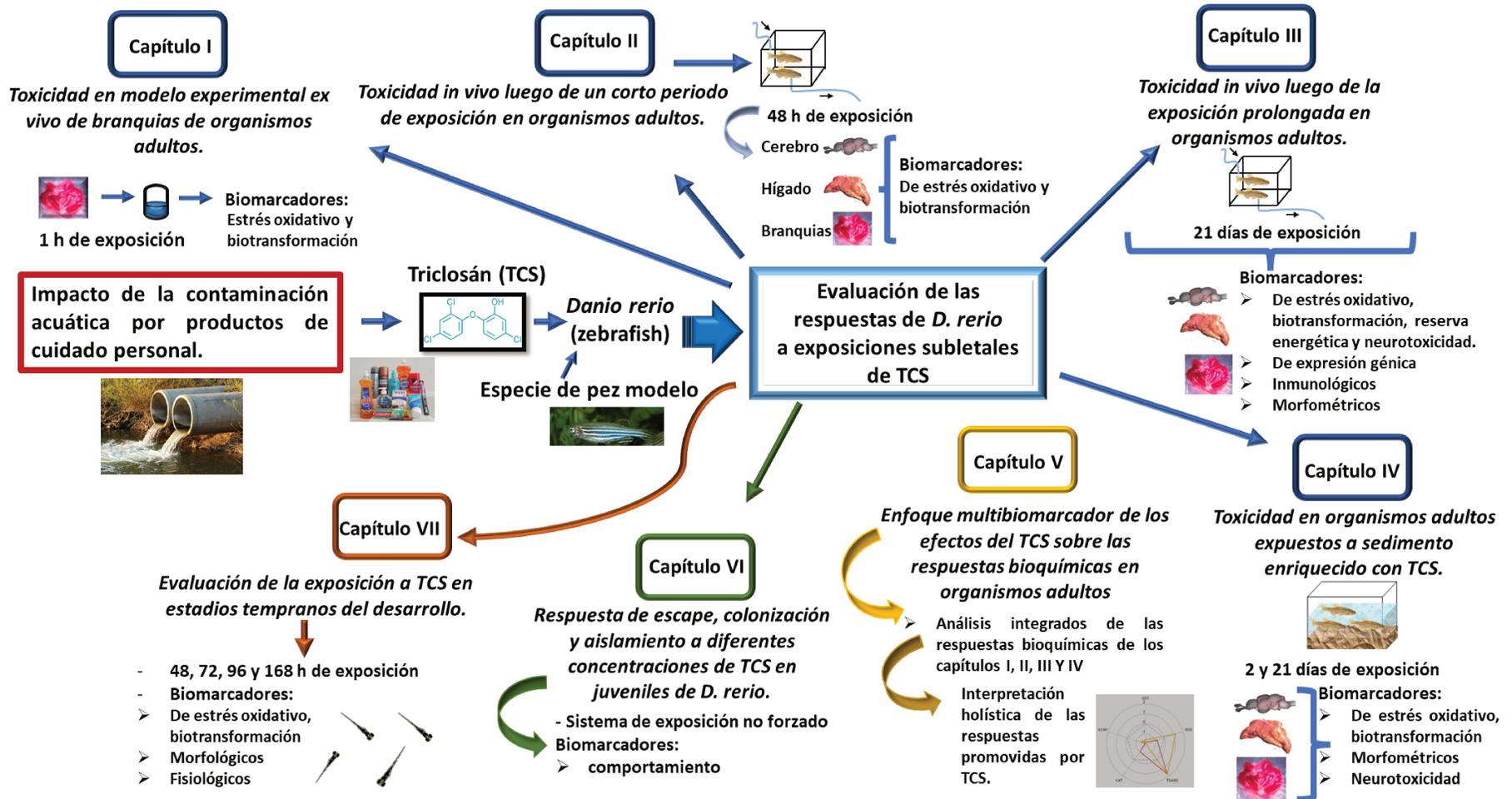


Figura 8. Esquema resumen de las diferentes evaluaciones de toxicidad del TCS en organismos de *D. rerio* abordados en la presente Tesis.

Capítulo I: Evaluación *ex vivo* de la toxicidad del triclosán en branquias de organismos adultos de *D. rerio*

4.1 Introducción

Los estudios *in vitro*, realizados en un ambiente controlado proporcionan una variabilidad reducida entre experimentos siendo rápidos y fáciles de operar. Además, poseen menores restricciones éticas que los bioensayos *in vivo*, por lo que son adecuados para ensayos preliminares de toxicidad. Por su parte la utilización de un enfoque *ex vivo* involucra una metodología realizada fuera del organismo, en un órgano extirpado (o secciones de órganos/tejidos), con cambios menores en las condiciones naturales del órgano. En este contexto, esta metodología constituye un modelo equilibrado entre los estudios *in vivo* e *in vitro* (Singh et al. 2018).

La exposición *ex vivo* se ha utilizado como una herramienta para la evaluación de toxicidad que supera las limitaciones logísticas de los ensayos *in vivo*, especialmente cuando se trata de peces, en términos de preservación de la arquitectura del órgano, relaciones morfo funcionales entre células adyacentes y una mejor conservación de los procesos metabólicos (Mieiro et al. 2019). En este sentido, el criterio basado en las respuestas de un órgano específico representa un valor agregado del ensayo *ex vivo*, ya que la conservación del microambiente normal de las células mejora el realismo del enfoque (Valant y Drobne 2011). En particular, las branquias son un órgano de interfase pez-agua, y están expuestas de manera permanente al ambiente exterior, lo que posibilita la simplificación de las condiciones del ensayo *ex vivo* al asumir el agua como medio de exposición.

Numerosas investigaciones probaron y validaron los ensayos *ex vivo* en peces con contaminantes tales como el fipronil (Santillán Deiú et al. 2021), nanopartículas de plata (Ale et al. 2021) y titanio (Mieiro et al. 2019), demostrando ser útiles y altamente sensibles para una detección rápida del potencial tóxico de los compuestos.

Hasta el momento no se han utilizado bioensayos de exposición *ex vivo* para obtener información general de los efectos del TCS en órganos clave de peces. Por lo tanto, con el fin de obtener una visión inicial de las respuestas de los biomarcadores para las posteriores determinaciones de toxicidad *in vivo*, el objetivo del presente capítulo es evaluar la toxicidad del TCS a través del diseño experimental *ex vivo* de branquias de organismos adultos de *D. rerio*.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Obtención, cría y mantenimiento de los ejemplares de *D. rerio*.

Los peces tipo salvaje fueron inicialmente suministrados por un comerciante local y transferidos a las instalaciones del Grupo de Estudios de Contaminación Antópica en Peces (GECAP). Con el objetivo de obtener un *stock* propio de peces, luego de un periodo de aclimatación, los mismos se aparearon y criaron rutinariamente en condiciones de laboratorio en acuarios con flujo continuo de agua no clorada. Los parámetros físico-químicos del agua estuvieron dentro de los recomendados para el adecuado desarrollo de *D. rerio* (Reed y Jennings 2011), con valores de oxígeno disuelto que oscilaron en 8.0 mg L⁻¹, pH 8.2 y conductividad 1000 μS cm⁻¹ y temperatura de 25 °C. Durante el periodo de aclimatación, reproducción, cría y ensayos, el fotoperiodo fue de 12:12 luz-oscuridad. Teniendo en cuenta las condiciones para la cría y reproducción descritas por Siccardi et al. (2009) las larvas y los juveniles fueron alimentados con alimento vivo (paramecios y artemias) hasta alcanzar la etapa adulta mientras que los organismos adultos fueron alimentados diariamente con alimento en escamas (TetraMin).

4.2.2 Preparación de soluciones de TCS

Se utilizó Irgasan (triclosan) provisto por Sigma-Aldrich (número de registro CAS: 3380-34-5) y pureza ≥97.0% (HPLC). Con el objeto de vehiculizar y disolver el TCS se prepararon soluciones stock con metanol. La elección de los solventes se basó en la recomendación de la OECD (2019) por ser de baja toxicidad y alta solubilidad (a 25 °C en metanol y acetona el TCS tiene una solubilidad de 1012 y 1158 gr L⁻¹, respectivamente (Aragón et al. 2008)). En este sentido, numerosas investigaciones han utilizado metanol (Ishibashi et al. 2004; Wang et al. 2019) y acetona (Perron et al. 2012) como solventes sin observar efectos adversos en la biota. En los estudios realizados en esta Tesis se

realizó el tratamiento de peces expuestos a metanol para evaluar su posible interferencia en la interpretación de los resultados de los organismos expuestos a TCS.

4.2.3 Diseño experimental

La exposición de las branquias se realizó adaptando la metodología propuesta por Britto et al. (2012) para peces de agua dulce. Se eligieron las siguientes concentraciones: 340 $\mu\text{g L}^{-1}$ (TCS1) por el CL50 (96 h) reportado para adultos de *D. rerio* (Oliveira et al. 2009) y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (TCS2) basado en los efectos citotóxicos promovidos en células branquiales de *Haliotis tuberculata* luego de una exposición *ex vivo* a TCS (Gaume et al. 2012). Los tratamientos ensayados fueron: solución salina fisiológica (control, Ctrl) (composición: 125 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 0,9 mM MgSO_4 ; 30 mM NaH_2CO_3 ; 1 mM NaH_2PO_4 ; 1,2 mM CaCl_2 y 10 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, pH 7.4); metanol al 0,05% en solución salina (control solvente, CtrlSv); y las dos concentraciones nominales de TCS antes mencionadas: 340 y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Las soluciones de TCS se prepararon a partir de una solución stock de 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ en metanol que luego se diluyó con solución salina hasta la concentración deseada. Cada unidad experimental estuvo conformada por las branquias de 3 individuos (n=6 por tratamiento) (Figura 9). Los peces fueron anestesiados mediante una inmersión de 3 minutos en agua helada, y luego de medirlos y pesarlos, fueron sacrificados por incisión detrás del opérculo. Los aparatos branquiales se extirparon y posteriormente se sumergieron en recipientes de vidrio conteniendo 10 mL de solución que permanecieron durante 1 hora bajo agitación continua a 25 °C. Luego del período de exposición, los aparatos branquiales fueron removidos de los recipientes y se conservaron a -80 °C hasta el momento de su procesamiento. Las concentraciones de TCS se consideraron constantes en todo el ensayo debido al breve período de exposición.

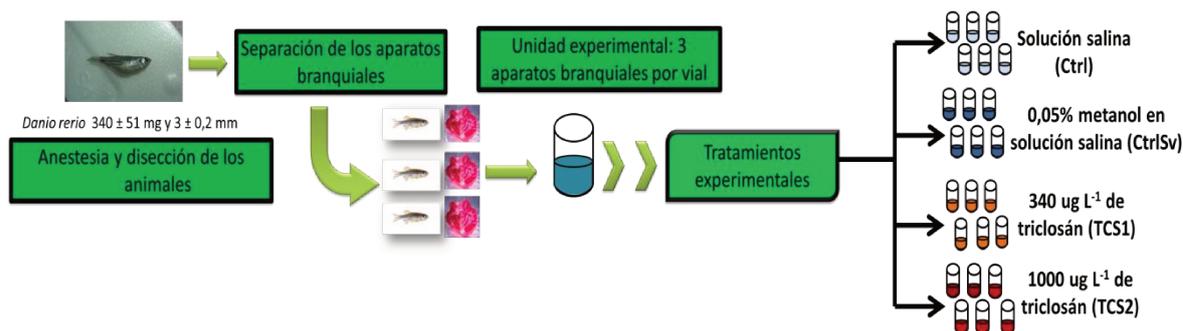


Figura 9. Diseño experimental de ensayo *ex vivo* con branquias de *D. rerio* expuestas a 2 concentraciones de TCS.

El contenido de GSH, ACAP y la actividad enzimática de GST se determinaron como se describe a continuación: las muestras de branquias fueron homogeneizadas para obtener la fracción post mitocondrial, con buffer PMS pH 7,4 (0,1M NaH₂PO₄; 0,15M KCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 10% v/v glicerol) en una relación 1:10. Para ello se utilizó un homogenizador de teflón hasta lograr la desintegración total del tejido (Nilsen et al. 1998). Para estimar el daño oxidativo en lípidos (a partir del contenido de TBARS), se utilizó este homogenato inicial sin centrifugar. Por otra parte, para la determinación del contenido de GSH, ACAP y la actividad de GST, los homogenatos obtenidos se centrifugaron a 20.000 *g* durante 20 min., a 4 °C, y luego se descartó el pellet y se separó la fracción sobrenadante para ser utilizada posteriormente en la determinación de los parámetros biomarcadores antes mencionados.

4.2.4 Determinación de marcadores de estrés oxidativo y biotransformación

La actividad de la GST (EC 2.5.1.18) se determinó utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno como sustrato (CDNB, Sigma 98%, según Habig et al. (1974) y Habig y Jakoby (1981), el cual es conjugado por la GST en presencia del glutatión reducido (GSH) formando GS-dinitrobenzoceno (GS-DNB). Los resultados se expresaron en unidades de GST * mg⁻¹ de proteína, donde una unidad se define como la cantidad de enzima que conjuga 1 nmol

de CDNB por minuto y por miligramo de proteína a 25 °C y pH 7,0. La actividad se estimó en un lector de microplacas (Synergy HTBiotek) a una longitud de onda de 340 nm.

La peroxidación lipídica se determinó midiendo la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúricas (TBARS) en condiciones ácidas y de calor según Ohkawa et al. (1979) con modificaciones de Oakes y Van Der Kraak (2003). Al homogenato se le agregó una mezcla compuesta de 8,1% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 20% de ácido acético (pH 3,5), 0,8% de ácido tiobarbitúrico y butilhidroxitolueno (BHT) 35 µM. Después de enfriar, se añadieron agua ultrapura y n-butanol (99,4%). Finalmente, la mezcla se centrifugó a 200 g durante 10 min a 15 °C para separar la fase orgánica, la cual se midió por fluorometría en un lector de microplacas (Synergy BioTek) a una longitud de onda de excitación de 516 nm y una longitud de onda de emisión de 560 nm. La concentración de TBARS se expresó como nmol de TBARS / g de tejido.

Para la determinación del contenido de GSH se siguió la metodología de Ellman 1959 con modificaciones de Venturino et al. (2001). Se mezclaron partes iguales de la fracción posmitocondrial (Nilsen et al. 1998) con ácido tricloroacético (TCA) 10% y luego se centrifugó la mezcla durante diez minutos a 10 °C y 10.000 g. La fracción sobrenadante obtenida fue utilizada inmediatamente para evaluar el contenido de glutatión en un medio conteniendo 5,5'-Dithiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) 1,5 mM y buffer fosfato de potasio 0,25 M pH 8,0. Los tioles ácido-solubles fueron cuantificados en espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 midiendo la absorbancia a 412 nm y utilizando una curva de calibración con GSH puro como estándar.

Para la determinación de ACAP se estimó la formación de ROS con un generador de radicales peroxilo (ABAP) de acuerdo con la metodología descrita por Amado et al. (2009) y modificaciones adoptadas por Monserrat et al. (2014). La capacidad

antioxidante se especifica por la diferencia en la fluorescencia de las muestras después de 30 min con y sin ABAP y se calcula mediante la siguiente expresión: $(FU\ 30\ min\ con\ ABAP - FU\ 30\ min\ sin\ ABAP) / FU\ 30\ min\ sin\ ABAP$. Como se obtienen altos niveles de fluorescencia después de agregar ABAP, se considera que la presencia de una alta diferencia de valores de fluorescencia entre las incubaciones con y sin ABAP son indicadores de una baja capacidad antioxidante, lo que sugiere una baja capacidad para neutralizar los radicales peroxilos (Amado et al. 2009).

4.2.5 Análisis estadístico

Se comprobó la normalidad de los datos y homogeneidad de varianza con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias significativas se evaluaron mediante ANOVA de una vía y para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Las comparaciones de los grupos tratados con TCS se realizaron respecto al grupo CtrlSv ya que proporciona una menor probabilidad de obtener resultados falsos negativos (Green y Wheeler, 2013). El análisis estadístico fue realizado con el software InfoStat (Di Rienzo et al. 2020).

4.3 Resultados

En la Figura 9 se muestran los resultados de los diferentes biomarcadores evaluados en branquias luego de la exposición *ex vivo* a dos concentraciones de TCS durante 1 h. No se observaron diferencias entre los grupos Ctrl y CtrlSv. En branquias expuestas a 340 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS la actividad de la GST aumentó significativamente (24%) y el contenido de GSH disminuyó un 48%. Asimismo, la capacidad antioxidante total contra radicales peroxilos disminuyó significativamente (65%). En branquias expuestas a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS no se observaron alteraciones en los biomarcadores mencionados anteriormente. Sin embargo, se observó un aumento en el contenido de TBARS en branquias expuestas a ambas concentraciones de TCS (340 $\mu\text{g L}^{-1}$: 204 % y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$: 142 %) luego de 1 h de exposición. La actividad de GST y contenido de ACAP se diferenciaron entre las branquias expuestas a 340 y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS.

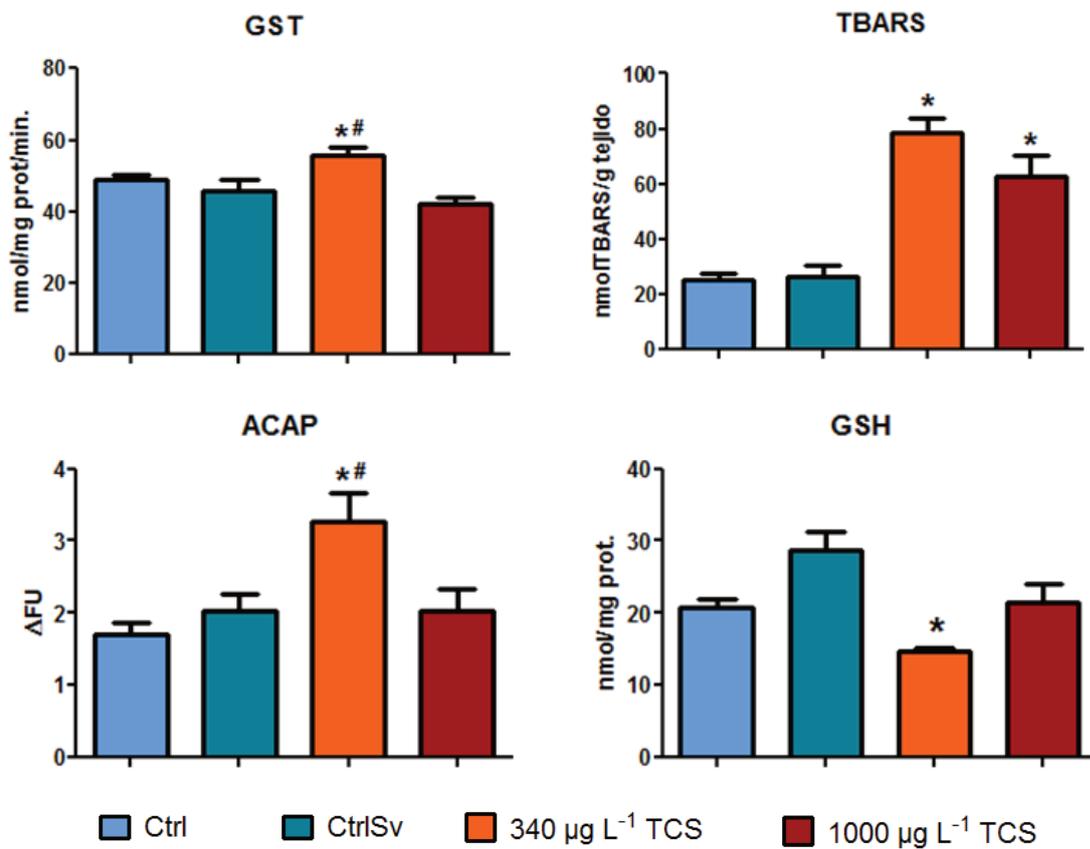


Figura 10. Biomarcadores en branquias de *D. rerio* luego de 1 h de exposición a dos concentraciones de TCS. *representan diferencias significativas con el grupo CtrlSv ($p < 0.05$). #representa diferencias entre las concentraciones de TCS. Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar.

4.4 Discusión

El modelo experimental de branquias demostró ser una prueba rápida y sencilla para evaluar los efectos a corto plazo del TCS sobre biomarcadores de estrés oxidativo. La ausencia de diferencias entre el grupo control y control con solvente evidencia que la solución salina utilizada fue adecuada y no alteró las características morfológicas y fisiológicas de las branquias, así como tampoco las respuestas sobre los biomarcadores evaluados.

Las branquias poseen una gran superficie en contacto directo con el medio externo, características que facilitan la entrada del TCS desde el agua. En este sentido, el ensayo *ex vivo* mostró que la exposición breve a $340 \mu\text{g TCS L}^{-1}$ promovió una disminución en la capacidad antioxidante total frente a radicales peroxilos reflejadas en el incremento de los valores de ACAP. La disminución en el contenido de GSH y el aumento en la actividad de la GST indicarían una respuesta compensatoria para contrarrestar la generación de radicales libres en las células branquiales, ya que la mayor actividad de GST indica mayor conjugación de GSH con el xenobiótico, disminuyendo el contenido de GSH en las células. Sin embargo, estos mecanismos no fueron suficientes para evitar el daño a nivel de lípidos observados en branquias expuestas a $340 \mu\text{g L}^{-1}$.

Asimismo, luego de la breve exposición a una concentración casi 3 veces mayor de TCS ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) se observó daño oxidativo en lípidos, aunque no hubo cambios en los biomarcadores antioxidantes y en la capacidad antioxidante total contra radicales peroxilos. La conjugación de GSH mediada por la GST es un mecanismo eficiente que contrarresta la generación ROS, por lo que un aumento en la actividad de GST disminuiría el contenido de GSH disponible en las células (Cnubben et al. 2001). Asimismo, la GST también tiene función antioxidante al eliminar los productos de la

peroxidación lipídica (Regoli y Giuliani 2011). Sin embargo, debido a la elevada concentración ensayada de TCS ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$), las defensas antioxidantes no funcionaron de manera eficiente para prevenir el daño en lípidos de las células branquiales. Los resultados del presente estudio permiten afirmar que los mecanismos detoxificantes no se activaron, aumentando de esta forma la acumulación de las ROS y desencadenando daño oxidativo en lípidos.

Los estudios que han generado información sobre la citotoxicidad órgano específica del TCS en organismos acuáticos son escasos y están principalmente asociados a estudios realizados bajo el modelo de incubación *in vitro*. Por ejemplo, Gaume et al. (2012) observaron alteraciones morfológicas en células branquiales del molusco *Haliotis tuberculata* expuestas a $2300 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS luego de 24 h de exposición. Asimismo, Canesi et al. (2007) observaron daño significativo sobre los hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* luego de la exposición *in vitro* a TCS. En este sentido, nuestros resultados aportan nueva evidencia sobre la alteración de marcadores bioquímicos promovidos por el TCS a través de la utilización del modelo experimental *ex vivo* de branquias.

Los datos obtenidos evidencian que la activación de las respuestas antioxidantes y el daño en lípidos fueron más evidentes en branquias expuestas durante 1 h a $340 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Debido a que dicha concentración es el valor de concentración letal 50 (CL50) a 96 h para *D. rerio* (Oliveira et al. 2009), resulta necesario considerar los efectos del TCS a concentraciones por debajo del CL50, pero a mayor tiempo de exposición.

La información aportada por los ensayos *ex vivo* representa un modelo valioso con respuestas rápidas que permiten evaluar la toxicidad de los PCP como es el TCS; no obstante, debe destacarse que los experimentos *in vivo* contribuyen a generar

información integrada sobre los efectos de los contaminantes sobre el organismo (Gaume et al. 2012). En este contexto, Canesi et al. (2007) observaron que el TCS indujo daños significativos a concentraciones menores en ensayos *in vivo* que en ensayos *in vitro* sobre parámetros de daño en el ADN, alteraciones lisosomales y apoptosis en hemocitos de *M. galloprovincialis*. En consecuencia, el bioensayo de toxicidad en branquias aquí propuesto con carácter exploratorio permitió evaluar las respuestas de los biomarcadores frente al TCS con el objetivo de obtener referencias de las concentraciones y tiempo de exposición para realizar los posteriores análisis de los efectos del TCS sobre *D. rerio*.

Capítulo II: Evaluación de la toxicidad del triclosán luego de un periodo corto de exposición en individuos adultos de *D. rerio*

5.1 Introducción

Diversas especies acuáticas son sensibles al TCS (Falfushynska et al. 2017) y numerosos estudios han concluido que este agente antimicrobiano es potencialmente tóxico para los peces (Ishibashi et al. 2004). Los efectos de la exposición a TCS luego de periodos cortos han sido estudiados en algunas especies de peces, tales como *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas*, *Lepomis macrochirus* y *Xiphophorus hellerii* (Foran et al. 2000; Liang et al. 2013; Nassef et al. 2009; Orvos et al. 2002). En este sentido Nassef et al. (2009) informaron comportamientos anormales y pérdida del equilibrio en individuos de *O. latipes* expuestos a 2,4 y 3 mg L⁻¹ de TCS durante 96 h. Oliveira et al. (2009) hallaron que a concentraciones superiores a 0,7 mg L⁻¹ de TCS, las larvas de *D. rerio* exhibían efectos teratogénicos, con retraso en el desarrollo embrionario y mortalidad dentro de las 48 h de exposición. Asimismo, estos autores concluyeron que las concentraciones de TCS iguales o superiores a 0,3 mg L⁻¹ constituyen un peligro para los ecosistemas acuáticos considerando los efectos en larvas de *D. rerio* en cortos periodos de exposición. Sin embargo, la evaluación de toxicidad del TCS se limitó principalmente a los efectos sobre el comportamiento, observándose natación irregular, pérdida de equilibrio y movimiento anómalo de las branquias. En contraste con la etapa larval, los estudios con organismos adultos que abordan los efectos a concentraciones subletales de TCS con un enfoque multibiomarcador están orientados a analizar los efectos sobre un único órgano (Oliveira et al. 2009) o bien sobre la regulación génica (Liang et al. 2013) en peces. En este contexto, las evaluaciones de toxicidad en órganos vitales luego de la exposición a TCS son necesarios para obtener resultados de respuestas tempranas promovidos por este xenobiótico. Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto de la exposición a concentraciones subletales de TCS en agua durante

48 horas en organismos adultos de *D. rerio*, a través de las respuestas de marcadores bioquímicos involucrados en procesos de biotransformación y estrés oxidativo en hígado, branquias y cerebro de los peces.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Diseño Experimental

Se utilizó un sistema de exposición de flujo continuo, de exposición forzada, el cual dispensó y diluyó continuamente la solución madre de TCS con el fin de administrar las concentraciones deseadas. Se empleó un sistema *batch* programable que alimentó las peceras de vidrio con capacidad de 17 L y un flujo continuo de 40 ml min⁻¹ (Figura 10) con renovación completa de los medios de exposición cada 7 horas (aproximadamente). Se ensayaron 4 tratamientos: Control con agua de red no clorada (Ctrl), control solvente (CtrlSv) con la concentración de metanol utilizada en la concentración de TCS más alta (0,004 % v/v) y dos concentraciones nominales de TCS: 200 µg L⁻¹ de TCS (TCS1) y 400 µg L⁻¹ de TCS (TCS2). Estas concentraciones son cercanas a las informadas para *D. rerio*: 340 µg L⁻¹ (CL50, 96hs) y 160 µg L⁻¹ (CI25, 9 días - inhibición de eclosión larval) (Oliveira et al. 2009). Las exposiciones se hicieron por 48 horas. Por cada tratamiento se hicieron *pooles* de 4 organismos (n= 8, 32 peces por tratamiento). Los peces fueron alimentados *ad libitum* dos veces por día. Después de las 48 horas, fueron anestesiados individualmente mediante una inmersión de 3 minutos en agua helada (Wilson et al. 2009). Luego se los sexó, pesó, midió y fueron sacrificados por incisión detrás del opérculo y se les extrajo el hígado, branquias, cerebro y se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento. La metodología fue aplicada respetando las recomendaciones de las Directrices para los Institutos Nacionales de Salud Local y Nacional (Universidad Nacional de Luján). En los diferentes tejidos se evaluaron: las actividades de GST, CAT, SOD y los niveles de TBARS y ACAP. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el marco ético para la investigación biomédica en animales y ganadería de laboratorio (CONICET, 2005) para proteger el bienestar animal.

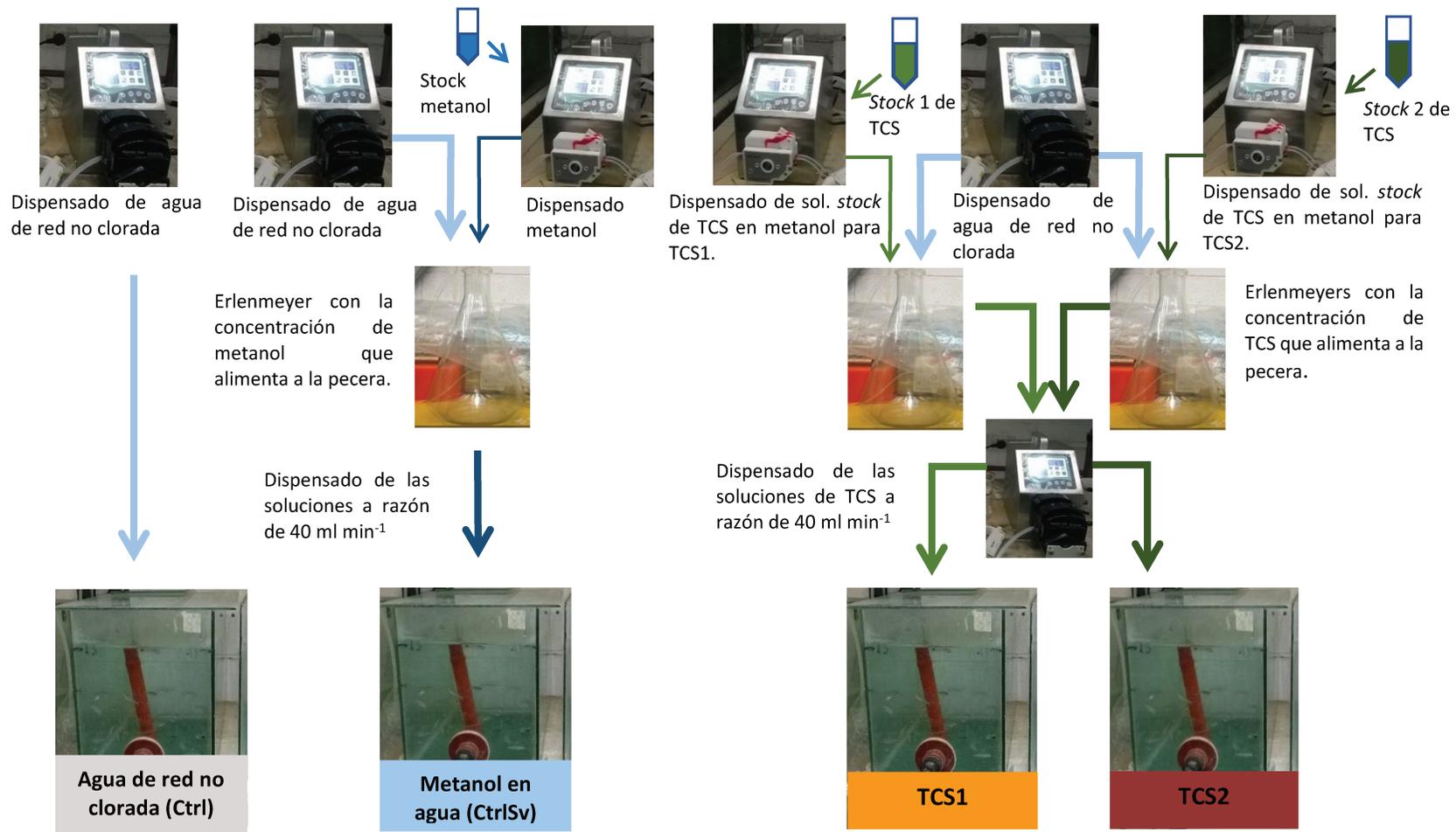


Figura 11. Sistema de flujo continuo para el dispensado de las soluciones en los ensayos de exposición en agua en organismos adultos de *D. rerio*.

5.2.2 Preparación de muestras biológicas

Las muestras de los diferentes tejidos (hígado, cerebro y branquias) fueron homogeneizadas individualmente para obtener la fracción post mitocondrial, con buffer PMS (ver capítulo I, sección 4.2.3) con pH 7,4 en una relación 1:10 para hígado y branquias; 1:8 para cerebro. Para ello se utilizó un homogenizador de teflón hasta obtener desintegración total del tejido (Nilsen et al. 1998). Los homogenatos obtenidos se centrifugaron a 20.000 g durante 20 min. a 4 °C, luego se descartó el pellet y se separó la fracción sobrenadante para ser utilizada posteriormente en la determinación de los biomarcadores (Figura 12).

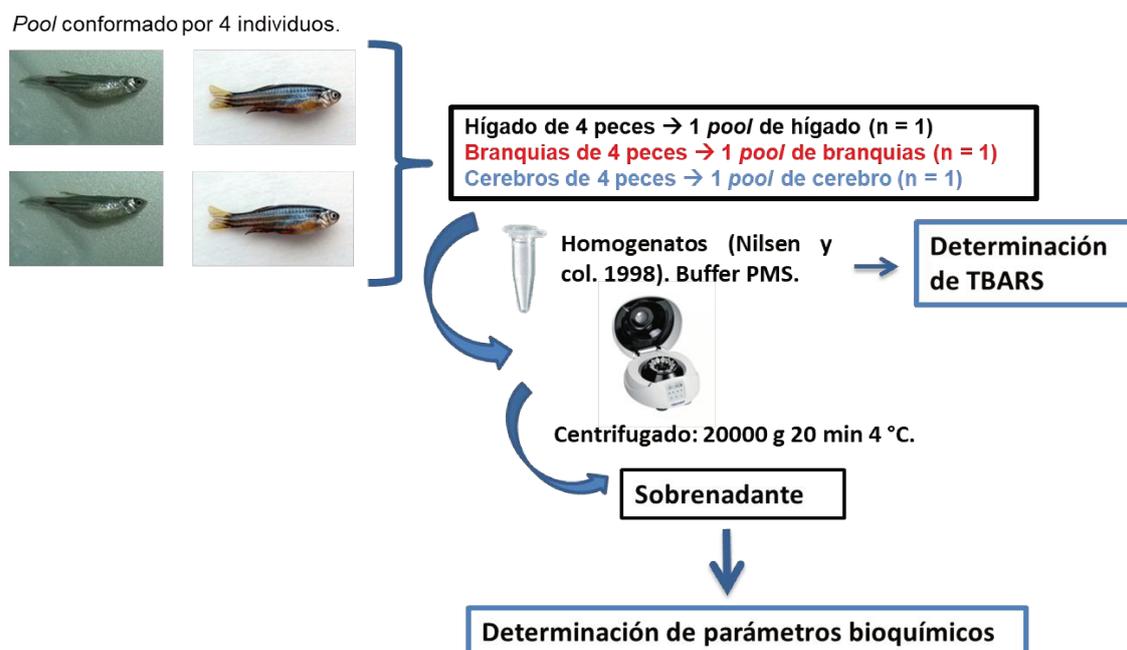


Figura 12. Esquema de preparación de los homogenatos de hígado, branquias y cerebro luego de las exposiciones a soluciones de TCS.

5.2.3 Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo, daño oxidativo y biotransformación

La actividad de la GST y el contenido de TBARS y de ACAP se estimaron según lo descrito en el capítulo I, sección 3.2.4.

La actividad de la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) se determinó siguiendo el método descrito por Beutler (1982), midiendo la velocidad de descomposición enzimática del peróxido de hidrógeno (Merck, Alemania), que se registró por disminución de absorbancia a 240 nm. La actividad enzimática se expresó en unidades CAT por miligramo de proteínas totales presentes en el homogenato, donde una unidad enzimática es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de H_2O_2 por minuto a 30 ° C y pH 8,0.

La actividad de la SOD (EC 1.15.1.1) se evaluó siguiendo un método indirecto que implica la inhibición de la reducción del Citocromo c por competencia con la SOD por el radical anión superóxido (McCord y Fridovich, 1969). La mezcla de reacción se realizó a 25 °C y contenía fosfato de potasio 50 mM con pH 7.8, EDTA 100 μM , citocromo c 10 μM y xantina oxidasa (0,025 unidades). Los cambios en la absorbancia se registraron a 550 nm. La actividad se expresó como unidades SOD * mg proteina^{-1} , donde 1 unidad SOD (U) se define como la cantidad de enzima que causa el 50% de inhibición de la reducción del Citocromo c por minuto.

5.2.4 Mediciones analíticas del TCS en agua y determinación de parámetros fisicoquímicos

Para la determinación de las concentraciones de TCS, se tomaron 3 muestras de agua de cada tratamiento ($n = 12$) en diferentes momentos del bioensayo (0, 24 y 48 h). Se utilizó un cromatógrafo Agilent modelo 1100 acoplado a un espectrómetro de masas (Canosa et al. 2005) de un solo cuadrupolo (Agilent modelo VL) con una fuente de ionización por electropulverización que funcionaba en modo negativo (Agilent Technologies Inc., Miami, FL, EE. UU.). Los iones moleculares característicos se seleccionaron inyectando una solución estándar de TCS de 1 mg L^{-1} en modo SCAN. Se eligieron los iones $m / z = 287,7$ y $288,7$ y se cargaron en el modo SIM. El límite de

detección fue de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ y el límite de cuantificación fue de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Como las concentraciones ensayadas estaban por encima de los límites de detección y cuantificación, no se realizó ningún proceso de extracción en las muestras de agua y, antes de la inyección directa, las soluciones se filtraron solo a través de membranas de nylon de $0,45 \mu\text{m}$. La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva de calibración a partir de soluciones estándar de TCS ($1-2-5-10-50-100-200-400 \mu\text{g L}^{-1}$) con un valor R^2 de 0,99 y la ecuación $y = 6142,3x$.

Con el objetivo de mantener las condiciones apropiadas para los peces, durante el tiempo de exposición se registraron variables fisicoquímicas en agua. El oxígeno disuelto (OD), el pH y la conductividad se estimaron con una sonda multiparamétrica *Hach* (HQ30D) y las mediciones se realizaron por triplicado. Para ello, se tomaron muestras de agua de cada tratamiento (en vasos de precipitado de vidrio) en tres momentos del período de ensayo (0, 24 y 48 horas).

5.2.5 Análisis estadístico

Se determinó la normalidad y la homogeneidad de la varianza de los datos con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias significativas entre los tratamientos se evaluaron mediante ANOVA de una vía y para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Las comparaciones de los grupos tratados con TCS se realizaron respecto al grupo CtrlSv. Con el objetivo de obtener una visión integral de las respuestas biológicas involucradas en la toxicidad del TCS luego de un período corto de exposición, se realizó un Análisis de Componentes principales (ACP) que incluyó a los 3 órganos, 4 tratamientos y 13 variables. Para la interpretación de los resultados del ACP se siguió la metodología de Legendre y Legendre (1979), los cuales establecen que las inferencias se pueden realizar con las

variables que poseen autovalores de la matriz de datos superiores a 1. Luego se estiman los coeficientes de correlación de cada variable, los cuales permiten inferir qué variables se correlacionan significativamente con las variables originales. Para que exista una correlación significativa, los coeficientes deben ser mayores a: $\sqrt{d/n}$, donde d es el número de componentes principales mayores a 1 y n el número de variables totales (Bacchetta et al. 2014). A modo de ejemplo: si se tienen 3 variables con autovalores mayores a 1, y un n: 13 variables, entonces $\sqrt{3/13} = 0,48$. Las variables con coeficientes de correlación mayores a 0,48 se correlacionarán significativamente con las variables originales. El análisis estadístico se realizó mediante el *software* InfoStat (Di Rienzo et al. 2012).

5.3 Resultados

5.3.1 Parámetros fisicoquímicos y concentraciones efectivas de TCS

En la Tabla 2 se muestran las variables fisicoquímicas. Ningún parámetro analizado mostró variaciones entre los tratamientos y todos se encontraron dentro del rango de lo permitido para el bienestar de los peces. No se registró mortalidad durante todo el periodo ensayado. Las concentraciones efectivas de TCS obtenidas de las mediciones analíticas realizadas mediante HPLC fueron la mitad de las concentraciones nominales, siendo TCS1: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ y TCS2: $189 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 2. Variables fisicoquímicas y concentraciones efectivas de TCS en bioensayo de corta exposición a TCS.

	Oxígeno disuelto (mg L^{-1})	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Concentración efectiva de TCS ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ctrl	$8,4 \pm 0,6$	$8,2 \pm 0,4$	$1000,0 \pm 5,0$	No detectado
CtrlSv	$8,1 \pm 0,7$	$8,5 \pm 0,4$	1005,0	No detectado
200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (nominal)	$7,1 \pm 1,4$	$8,5 \pm 0,1$	$988,0 \pm 4,0$	$100,1 \pm 14,0$
400 $\mu\text{g L}^{-1}$ (nominal)	$7,1 \pm 0,4$	$8,5 \pm 0,1$	$997,0 \pm 12,0$	$189,6 \pm 20,0$

Los valores se presentan como la media \pm desvío estándar.

5.3.2 Biomarcadores de estrés oxidativo y biotransformación

Los resultados de los biomarcadores medidos en hígado de *D. rerio* luego de la exposición a TCS durante 48h se muestran en la Figura 13. No se observaron diferencias significativas en los biomarcadores evaluados entre el grupo Ctrl y CtrlSv. Asimismo, tampoco se observaron diferencias en la actividad de SOD ni en el nivel de ACAP, mientras que se evidenció un aumento significativo del 40% en los niveles de TBARS tanto en organismos expuestos a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ y $189 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS respecto a CtrlSv. Sin

embargo, se detectó una inhibición del 26% en la actividad de CAT de hígado de los peces expuestos a $189 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, mientras que la actividad de GST disminuyó en un 32% en ambas concentraciones en relación con CtrlSv.

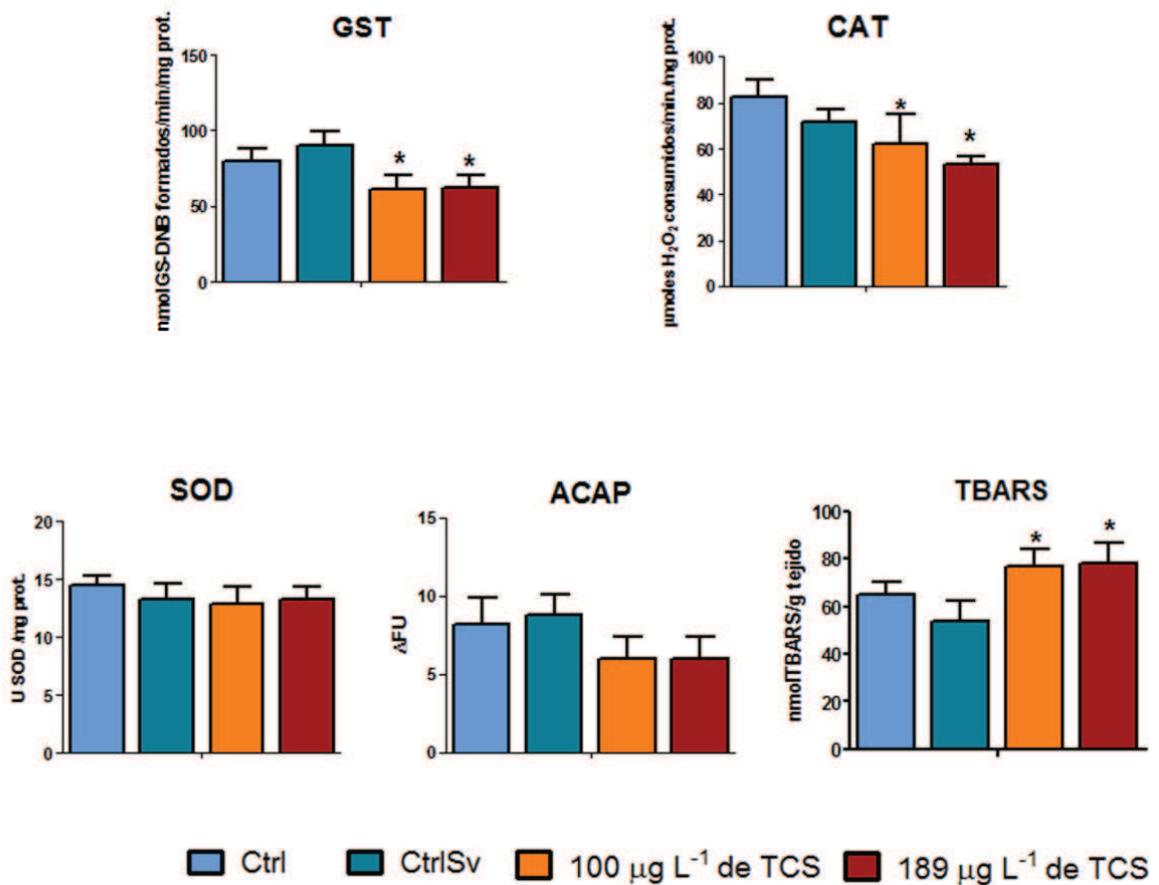


Figura 13. Biomarcadores hepáticos de *D. rerio* luego de 48 horas de exposición a dos concentraciones de TCS. * representan diferencias significativas con el grupo CtrlSv ($p < 0.05$). Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar.

En la Figura 14 se muestran los biomarcadores en branquias de *D. rerio* luego de las 48 horas de exposición a TCS. En este sentido, la actividad de CAT se inhibió significativamente (41%) después de la exposición a $189 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, con respecto a CtrlSv y la de la SOD aumentó (15%) en organismos expuestos a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, mientras que la actividad de GST evidenció un aumento significativo en ambas

concentraciones (25% y 16% en organismos expuestos a 100 y 189 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, respectivamente). La peroxidación lipídica no mostró cambios respecto al CtrlSv para ninguna de las concentraciones de TCS ensayadas.

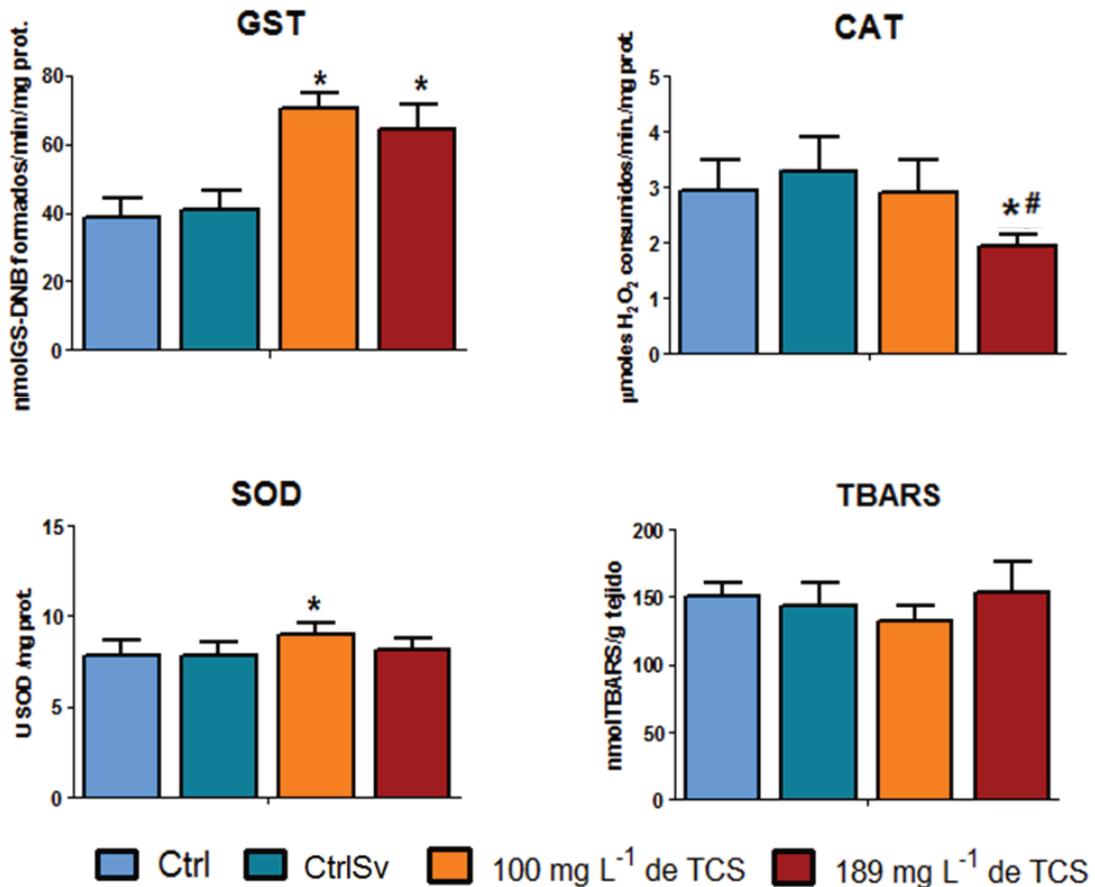


Figura 14. Biomarcadores en branquias de *D. rerio* luego de 48 horas de exposición a dos concentraciones de TCS. *representan diferencias significativas con el grupo CtrlSv ($p < 0.05$). #representa diferencias entre las concentraciones de TCS. Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar.

En la Figura 15 se muestran los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados en cerebro de *D. rerio* luego de la exposición aguda a TCS. No hubo diferencias significativas en la actividad enzimática de CAT mientras que en la actividad de GST se observó un aumento significativo en organismos expuestos a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS (25%) respecto al CtrlSv. Asimismo, se observó un aumento significativo en la capacidad antioxidante total en

cerebro de organismos expuestos a $189 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS (45%) y disminución de los niveles de TBARS (22%).

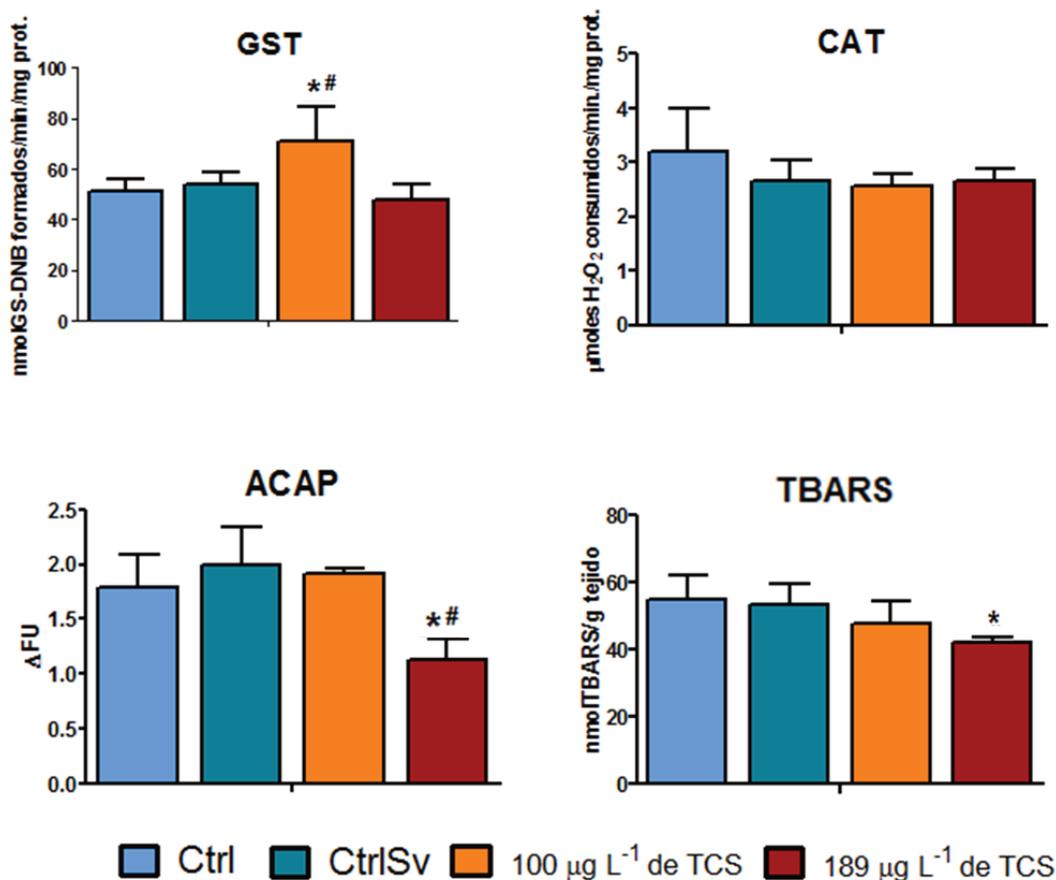


Figura 15. Biomarcadores en cerebro de *D. rerio* luego de 48 horas de exposición a dos concentraciones de TCS. *representan diferencias significativas con el grupo CtrlSv ($p < 0.05$). #representa diferencias entre las concentraciones de TCS. Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar.

5.3.3 Análisis de componentes principales

El ACP (Figura 16) evidenció que la mayor parte de la varianza total de los datos (62%) pudo explicarse por los dos primeros componentes (CP1 y CP2). El ACP indicó que 3 autovalores fueron mayores a 1, entonces los coeficientes de correlación $>0,48$ fueron los que mejor explicaron la variabilidad del ACP. El CP1 explicó el 42% del total de la varianza de los datos y ordenó principalmente los organismos controles (sobre el lado derecho) de los organismos expuestos a TCS del lado izquierdo. En este sentido, las

variables negativas estuvieron mayormente relacionadas a los grupos expuestos a TCS y las positivas a los grupos control. Las variables positivas que explicaron dicha separación fueron: GST en branquias y TBARS en hígado; y las que lo hicieron negativamente GST, CAT y ACAP en hígado y CAT, TBARS y ACAP de cerebro. El CP2 (20% de la varianza total) separó las concentraciones de TCS (189 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$). Este eje mostró sólo correlaciones positivas con: CAT y SOD de branquias, GST, ACAP y TBARS de cerebro. Es decir, las separaciones entre ambas concentraciones se explican principalmente por los biomarcadores en dichos órganos.

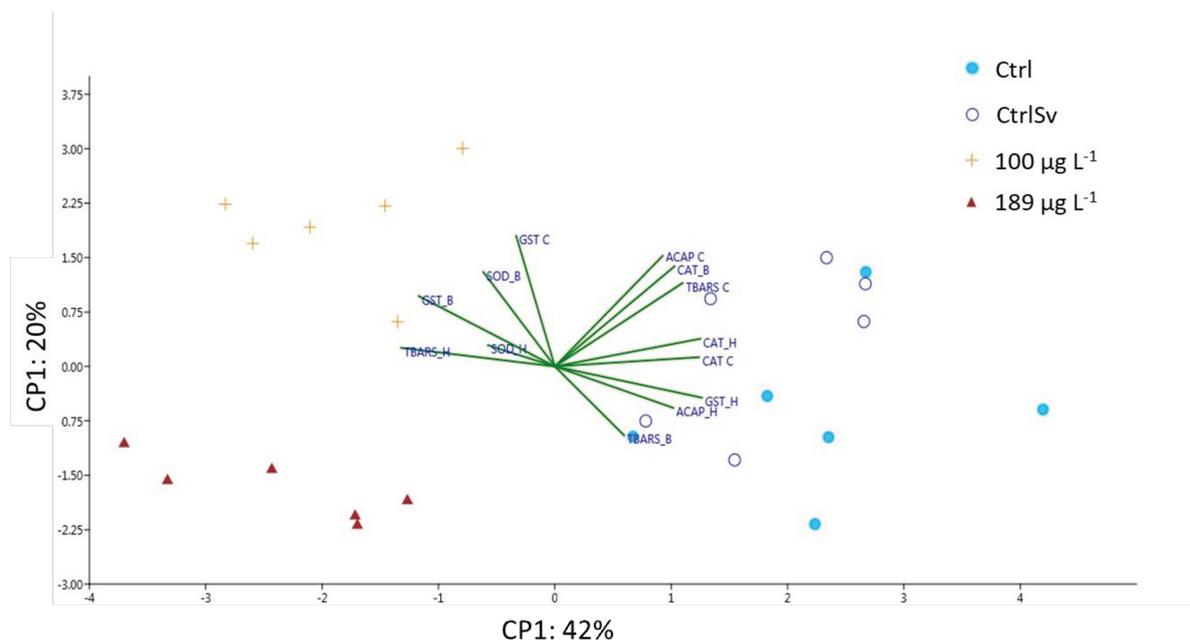


Figura 16. Análisis de componentes principales. Representación de los biomarcadores y grupos de individuos por tratamiento (cada punto representa un *pool* de organismos). Las abreviaturas de los biomarcadores están explicadas en el texto. H: hígado, C: cerebro y B: branquias.

5.4 Discusión

En el presente capítulo se evaluaron respuestas biológicas generadas en adultos *D. rerio* luego de la exposición aguda a TCS. Los resultados muestran que el producto antibacteriano produce cambios en biomarcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes en hígado, branquias y cerebro, generando un riesgo potencial en la salud de estos peces.

La exposición de los organismos a contaminantes que generan ROS, da como resultado la inducción o inhibición de enzimas antioxidantes (Ku et al. 2014). La respuesta de inhibición en hígado de *D. rerio* en la actividad de la GST observada luego de las 48 h de exposición, concuerda con lo informado para *Pelteobagrus fulvidraco* luego de una exposición de 24 h a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS (Ku et al. 2014). Regoli y Giuliani (2011) explicaron que la enzima GST también podría prevenir el daño de los lípidos en este tejido al conjugar algunos subproductos de la hidroxidación de lípidos. En este sentido, la inhibición de GST podría explicar el aumento significativo en los niveles de TBARS en hígado de los organismos expuestos a TCS. Ates et al. (2018) encontraron que en *D. rerio* el metilparabeno elevó el contenido de TBARS y disminuyó la actividad de GST. En relación a CAT, ambas concentraciones de TCS indujeron inhibición significativa de su actividad en el hígado de los peces, lo que concuerda por lo reportado por Araújo et al. (2019) quienes encontraron una disminución en la actividad de CAT en *Solea senegalensis* después de 48 horas de exposición de TCS.

Cuando se consideraron los efectos sobre las branquias, los resultados indicaron que el aumento observado en la actividad de GST pudo haber prevenido que el tejido sufra daño oxidativo ante ambas concentraciones de TCS. Araújo et al. (2019) informaron una respuesta similar en *Solea senegalensis*, también el estudio de Hemalatha et al. (2019)

llegó a resultados similares a través de la exposición de *Labeo rohita* os a 39 y 78 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS durante 7-35 días. Asimismo, en un estudio llevado a cabo por el propio laboratorio (Sager et al. 2022) se observó un aumento en la actividad de GST y ausencia de peroxidación lipídica en branquias de *Corydoras paleatus* expuestos durante 48 h a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS.

La actividad de SOD en *D. rerio* aumentó cuando los peces estuvieron expuestos a la concentración más baja de TCS (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) pero no a 189 $\mu\text{g L}^{-1}$. Este comportamiento en la actividad de SOD también fue informado por Hemalatha et al. (2019) en *L. rohita* después de una exposición de 7 días a TCS, donde la actividad más alta se mostró en la concentración más baja probada (39 $\mu\text{g L}^{-1}$). Resultados semejantes fueron observados en branquias *Corydoras paleatus* luego de 48 h de exposición a 189 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS (Sager et al. 2022). En consecuencia, las respuestas observadas en la actividad de dicha enzima pueden deberse a que su síntesis o actividad aumentaran bajo estrés adverso leve (Shao et al. 2012), contrarrestando los efectos de los radicales libres mientras que a mayores concentraciones otros sistemas de defensas como GSH contrarrestan los aniones superóxidos (Sun et al. 2007).

La inhibición de CAT en branquias de organismos expuestos a 189 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS observada en el presente estudio mostró una dependencia del tiempo/exposición que pudo deberse al aumento de la concentración del H_2O_2 celular. En este sentido, el exceso de H_2O_2 puede generar que la capacidad de los antioxidantes disminuya con el agotamiento de actividades enzimáticas como la de CAT (Nordberg y Arner 2001; Shao et al. 2012). En este contexto, Araújo et al. (2019) demostraron resultados similares cuando individuos de *S. senegalensis* fueron expuestos durante 48 h a 280 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS. Hemalatha

et al. (2019) observaron el mismo patrón de inhibición de CAT en carpas expuestas a TCS durante 35 días.

Para poder ingresar a las células, los xenobióticos deben difundir a través de las barreras celulares. El grupo de células endoteliales que recubren las regiones vasculares que irrigan el cerebro con uniones extremadamente estrechas (Di Giulio y Hinton, 2008) se conoce como barrera hematoencefálica, la cual muchas veces funciona como defensa contra el paso de los contaminantes. Sin embargo, este mecanismo no habría logrado impedir el ingreso del TCS dado que se evidenciaron cambios en el tejido respecto al grupo CtrlSv. Los resultados en cerebro de los peces demostraron que la exposición de *D. rerio* a $189 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS promovió el aumento de la capacidad antioxidante total contra radicales peroxilos y la disminución de TBARS. En este sentido, varias enzimas como las peroxidasas y las fosfolipasas convierten los lípidos dañados en productos inocuos por degradación (Kohen y Nyska, 2002). Dicho mecanismo podría explicar las concentraciones más bajas de TBARS encontradas en cerebro de *D. rerio* después de la exposición a TCS.

La ausencia de cambios en la actividad de la CAT concuerda con los resultados obtenidos para cerebro de *C. paleatus* expuestos durante 48 h a 100 y $189 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS (Sager et al. 2022). En este sentido, CAT no parecería ser un biomarcador sensible luego de una corta exposición a TCS en cerebro de los peces.

Es importante destacar que un biomarcador único y aislado no es suficiente para reflejar el estado de salud de un organismo, por lo tanto, para realizar una evaluación completa y obtener una visión integral de los efectos toxicológicos de TCS luego de 48 h de exposición, se empleó el ACP con el fin de sintetizar e integrar la información obtenida en los diferentes órganos sobre las respuestas de los biomarcadores en *D. rerio*.

Considerando los 3 órganos de cada individuo (hígado, branquias y cerebro), el ACP permitió determinar una clara diferenciación de los peces control respecto de los tratados con TCS que fue explicada por el CP1. Los biomarcadores que explican la separación fueron TBARS, GST y CAT en hígado y branquias. En este sentido, *D. rerio* exhibió baja capacidad para evitar el daño oxidativo en lípidos en ambos órganos. Por otro lado, ambas concentraciones también se diferenciaron entre sí, siendo el CP2 el que explica sus diferencias dadas principalmente por los biomarcadores en cerebro (GST y ACAP), y en menor medida en branquias (TBARS). En este contexto, las concentraciones ensayadas de TCS no tendrían el mismo efecto en cerebro, con una correlación positiva de la menor concentración con la actividad de la GST y la capacidad contra radicales peroxilos.

Las condiciones de exposición aguda indicadas en esta sección de la tesis representan un escenario que pudieran ser representativas de un evento local espacialmente reducido de aguas residuales no tratadas. En este contexto, ante un escenario de altas concentraciones subetales de TCS, la perturbación sobre el sistema antioxidante observada aquí resulta en una herramienta que permite anticipar y predecir los efectos a corto plazo que este xenobiótico tiene sobre los peces.

**Capítulo III: Evaluación de la toxicidad del
triclosán luego de la exposición
prolongada en organismos adultos de *D.*
*rerio***

6.1 Introducción

La evaluación de los efectos subletales en organismos acuáticos luego de la exposición a PCP ha cobrado importancia en las últimas décadas. En este sentido, los ensayos de exposición *in vivo*, en donde los organismos son expuestos durante una parte de su ciclo de vida, han sido motivo de estudio (Aswathy et al. 2021; Fent et al. 2010 Martins et al. 2017; Paul et al. 2019, 2020; Wang et al. 2020 Yamauchi et al. 2008). En consecuencia, la evaluación de los potenciales efectos de contaminantes luego de exposiciones crónicas, y considerando una batería de biomarcadores, ha cobrado importancia cuando se trata de organismos acuáticos como los peces. Las estimaciones de toxicidad subletales con mayor tiempo de exposición permiten estudiar efectos generados por concentraciones ambientalmente relevantes, lo que destaca aún más la importancia de esta clase de estudios para el ecosistema acuático dado que es mayor su relevancia a nivel ambiental.

La evaluación de las características hematológicas de los peces se ha convertido en un importante biomarcador para comprender los procesos normales y patológicos, así como los impactos toxicológicos de los compuestos sobre el sistema inmune de los peces (Sudová et al. 2008). En los vertebrados, los leucocitos (glóbulos blancos) son células heterogéneas con acción inmunológica que ayudan a combatir patógenos y enfermedades (Martin et al. 2008). Se clasifican en granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y agranulocitos (monocitos y linfocitos); y se pueden distinguir en base a sus características morfológicas y funcionales (Burgos-Aceves et al. 2021). La exposición de los organismos a los compuestos potencialmente tóxicos puede producir efectos sobre el sistema inmune suprimiendo la respuesta inmunitaria, lo que conduce a una mayor susceptibilidad a los agentes infecciosos (Abdel-Mageid et al. 2020). En este contexto,

numerosos estudios han evaluado las alteraciones inmunológicas en peces, promovidas por aguas residuales y contaminantes tales como endosulfan, cipermetrina, carbofurano y bisfenol-A (Adhikari et al. 2004; Bachetta et al. 2014; Cazenave et al. 2014; Qui et al. 2016). Sin embargo, hasta el momento no se han evaluado los efectos de la exposición prolongada a TCS sobre parámetros inmunológicos en organismos adultos de *D. rerio*.

Por otra parte, las reservas energéticas son parámetros biológicos determinantes en la fisiología de los seres vivos, desempeñando un papel fundamental en su supervivencia y el funcionamiento, así como en los mecanismos de adaptación y la tolerancia al estrés. En caso de exposición a un agente estresor, la distribución energética en el pez puede alterarse. Una gran proporción de la energía que proviene de las reservas tisulares debe ser utilizadas para los procesos de detoxificación y restablecimiento de la homeostasis (Viant et al. 2003). En este sentido, el hígado y el músculo son los principales órganos involucrados en el metabolismo energético. En particular, los lípidos son las principales moléculas de almacenamiento energético ya que contienen más energía por gramo que cualquier otra biomolécula (Weber, 2011). En cuanto a las proteínas, su síntesis implica uno de los principales gastos de energía celular (Treberg et al. 2016) y se considera que son un combustible de último recurso. De esta manera, las reservas energéticas en términos de contenido de proteínas y lípidos en hígado y músculo de peces pueden ser consideradas como indicadores de la condición general del organismo y los cambios en sus concentraciones han sido utilizados en múltiples investigaciones como biomarcadores de efecto ante diferentes situaciones de estrés (Rossi et al. 2017; Fantón et al. 2021). Hasta el momento, no se ha estudiado el metabolismo energético de *D. rerio* luego de la exposición a TCS.

Además, la expresión génica en peces se ha utilizado para evaluar los efectos de contaminantes como el TCS a través de técnicas tales como *microarrays* (Haggard et al. 2016; Wang et al. 2019), y cuantificación relativa de la expresión génica (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o qPCR). Los ensayos de *microarrays* sirven para determinar los cambios en los patrones de expresión de un conjunto de genes, pero no permiten identificar qué gen en particular se modificó en su expresión. Por otro lado, la qPCR relativa permite cuantificar la expresión diferencial de un gen conocido (o genes de interés) en organismos expuestos a un contaminante, en relación con un grupo control. En este contexto, se han evaluado diversos genes de peces luego de la exposición a TCS, tales como los involucrados en la síntesis de mielina (*mbp*), genes neurológicos (*pax2a*, *pax6a* y *hoxb1b*), relacionados con la visión (*gnat2*, *pde6a*, *pde6g*, *grk1b*), entre otros (Haggard et al. 2016; Pullaguri et al. 2020).

Un gen de relevancia en el proceso de defensa celular frente al estrés oxidativo es el que codifica para el factor de transcripción nuclear Nrf2. Nrf2 pertenece a una familia de proteínas responsables de la protección contra el estrés oxidativo (Venugopal y Jaiswal 1996; Fainstein, 2007) ya que al entrar al núcleo celular activa una serie de genes a través del elemento de respuesta a los antioxidantes (ARE) (Kobayashi y Yamamoto, 2005). En condiciones normales, Nrf2 se encuentra regulada negativamente por la asociación con la proteína Keap1 y la unión al citoesqueleto (Figura 17). Sin embargo, en presencia de ROS, el complejo Nrf2-Keap1-citoesqueleto se pierde y Nrf2 pasa del citosol al núcleo. Una vez en contacto con el sitio ARE, se promueve la transcripción de algunos de los genes objetivo típicos de Nrf2 como son la GST isoforma pi, subunidades de glutamato-cisteína ligasa, hemooxigenasa 1, entre otras enzimas protectoras del estrés oxidativo. En este sentido, se ha demostrado la sobreexpresión del gen de *nrf2* en respuesta a

xenobióticos (Wang y Gallagher 2013; Wang et al. 2021) y si bien se han reportado estudios de evaluación temprana sobre la expresión de *nrf2* promovido por TCS (Bao et al. 2021; Wang et al. 2020), poco se conoce sobre su expresión luego de un periodo prolongado de exposición a TCS.

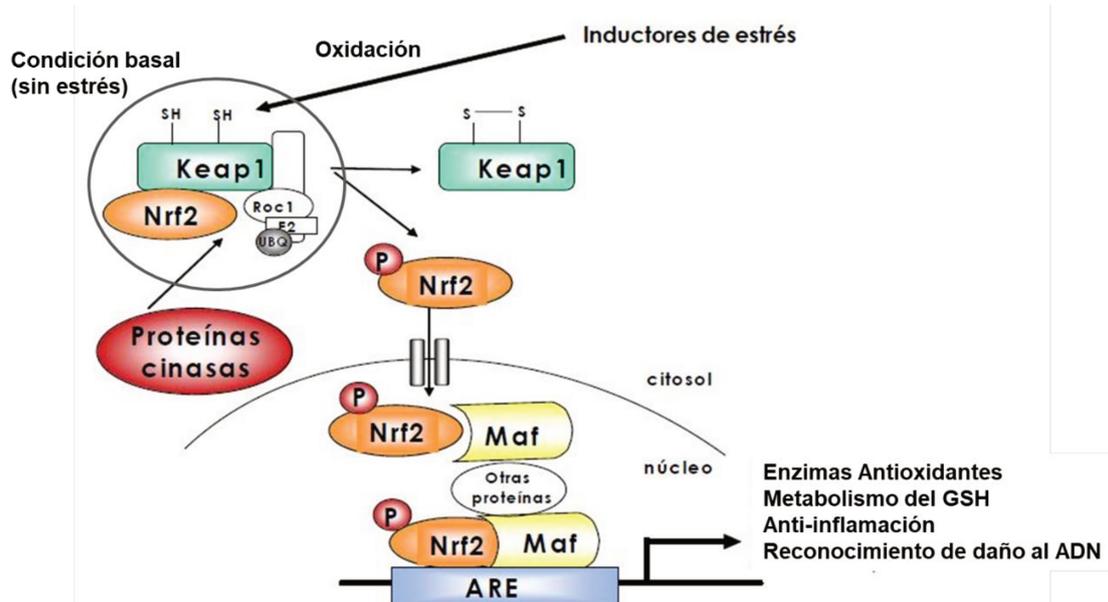


Figura 17. Mecanismo de acción de Nrf2. Cuando Nrf2 se disocia de Keap1 y se transloca al núcleo forma heterodímeros con la pequeña proteína Maf, lo cual facilita su interacción con las regiones ARE del ADN y la consecuente transcripción de genes antioxidantes y enzimas de fase II. Figura modificada de Fainstein (2007).

Por otro lado, los citocromos P450 (CYP) son una superfamilia de monooxigenasas involucrados en los procesos de biotransformación de fase I. Las isoformas CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4 se han reconocido como responsables de la desintoxicación de sustancias químicas exógenas y del metabolismo de sustratos endógenos (Li et al. 2013). La CYP1A1 pertenece a la subfamilia de los citocromos P450 que desempeña una función importante en el metabolismo de los xenobióticos como el TCS (Uno et al. 2012; Wu et al. 2017). Asimismo, debido a la similitud estructural del TCS con los policlorobifenoles, el bisfenol A, las dioxinas y el dietilestilbestrol, la sobreexpresión o subexpresión de *cyp1a* puede estar asociada con las alteraciones en las respuestas del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR). El AhR es un factor de

transcripción que, al activarse por unión a un ligando, promueve la transcripción de *cyp1a* en mamíferos (Nebert y Karp 2008). En este sentido, Li et al. (2013) y Ku et al. (2014) han demostrado que la inducción de las isoformas de la familia *cyp1a* está regulada por el factor de transcripción AhR en peces.

El hígado es el principal órgano donde ocurre el proceso de biotransformación, por lo que resulta de interés evaluar la expresión de *cyp1a* en dicho órgano. En este contexto, el efecto del TCS en los niveles de expresión de ARNm de *cyp1a* no ha sido evaluado en peces luego de periodos prolongados de exposición.

Otro grupo de genes de interés son los que codifican para las diferentes isoformas de la GST. La diversidad de sustratos para GST es el resultado tanto de la naturaleza relativamente no específica del sitio de unión al sustrato hidrofóbico y debido a la existencia de numerosas isoformas de GST (Cnubben 2001), tales como alfa, mu, pi, sigma, entre otras. Las GST participan en la defensa contra el estrés oxidativo ya que son capaces de detoxificar compuestos nocivos endógenos como hidroxialquenes y propenales básicos (productos de descomposición de la peroxidación lipídica) o hidroperóxidos de ADN, pero también xenobióticos electrofílicos y/o intermediarios reactivos formados durante su biotransformación como epóxidos y quinonas (Tew, 1994; Hayes y Pulford, 1995). Se ha demostrado que la isoforma GST pi puede desactivar productos de peroxidación lipídica tales como bases de ADN oxidativas, hidroperóxidos lipídicos y sus derivados como hidroxialquenes, malondialdehídos y propenales básicos (Ketterer y Christodoulides, 1994; Berhane et al. 1994; Cnubben et al. 2001). Además, GST pi puede reaccionar directamente con ROS a través de un grupo -SH sensible y causar inactivación por formación de disulfuro que puede ser revertida por GSH. Por lo dicho, GST isoforma pi tiene un papel específico en el estrés oxidativo y

resulta de interés evaluar los niveles transcripciones de *gst pi* luego de un período de exposición prolongada a TCS.

Por su parte el gen *cyp19* transcribe para la proteína aromatasa del citocromo P450, la cual cataliza la aromatización de andrógenos a estrógenos, paso clave para la biosíntesis de estrógeno (Sawyer et al. 2006) y por lo tanto para la reproducción de los peces. La aromatasa se expresa en gónadas, placenta, cerebro y muchos otros tejidos blancos, donde se posiciona para regular la ubicación, el momento y la cantidad de estrógeno disponible (Sawyer et al. 2006). En los peces, existen dos isoformas de la aromatasa P450 estructural y funcionalmente distintas, que están codificadas por loci de genes separados: *cyp19a* y *cyp19b*, y se expresan predominantemente en ovario y cerebro, respectivamente (Zhao et al. 2001). La actividad de la aromatasa puede afectar el equilibrio de andrógenos y estrógenos (Tian et al. 2010; Han et al. 2010) y se sabe que *cyp19b* se encuentra regulada a través de un circuito de retroalimentación positivo que es impulsado por 17β estradiol en el cerebro de los peces (Callard et al. 2001; Ji et al. 2013). Asimismo, *cyp19b* es inducible por sustancias estrogénicas exógenas en peces adultos (Kishida y Callard, 2001; Kishida et al. 2001). Los efectos estrogénicos, están bloqueados por un antagonista del receptor de estrógeno (ER) y por la presencia de múltiples elementos de respuesta al estrógeno (ERE) y sitios en la región reguladora del gen *cyp19b*, lo que implica que dicho gen es un objetivo directo de la acción del estrógeno/ER (Kazeto et al. 2004; Tchoudakova et al. 2001). El TCS es estructuralmente similar a las sustancias químicas que producen disrupción endócrina tales como bisfenol A, tetracloro-p-dibenzo-dioxina, entre otros (Jacobs et al. 2005). En este sentido, el TCS ha sido reportado como un disrruptor endócrino ya que posee una actividad estrogénica en peces (Wang et al. 2017). El aumento de la expresión del ARNm de *cyp19b* ha sido

demostrado en cerebro de *Cyprinus carpio* luego de una exposición a TCS (Wang et al. 2017, 2018). A la fecha, el efecto de la exposición prolongada a TCS en machos adultos de *D. rerio* en la expresión transcripcional de *cyp19b* no ha sido evaluado.

Con relación a lo expuesto, se evidencia que existen estudios que evaluaron los efectos de la exposición a TCS sobre la expresión génica y marcadores bioquímicos, los cuales han estado principalmente enfocados a periodos cortos de exposición y sobre estadios temprano del desarrollo de *D. rerio*. Sin embargo, resulta necesario incorporar información adicional sobre otras respuestas tales como las asociadas a parámetros biomarcadores inmunológicos y de metabolismo energético. En este contexto, hasta el momento no se ha considerado la evaluación integral de la exposición prolongada del TCS sobre parámetros de estrés oxidativo y biotransformación a nivel enzimático y génico, así como tampoco sobre parámetros inmunológicos y de metabolismo energético en organismos adultos de *D. rerio*. Por lo tanto, debido a la ausencia de enfoques que integren los parámetros mencionados, se plantearon los siguientes objetivos: 1) estudiar los efectos de la exposición a soluciones subletales de TCS sobre parámetros asociados a procesos de biotransformación, de estrés oxidativo, parámetros metabólicos y a procesos de respuesta inmune en organismos adultos de *D. rerio* luego de 21 días de exposición. Y 2) examinar la expresión de los genes vinculados con respuestas a estrés oxidativo (*nrf2*, *gstpi*), biotransformación (*cyp1a*) y disrupción endócrina (*cyp19b*) en organismos adultos de *D. rerio* luego de 21 días de exposición.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Diseño experimental

El diseño experimental fue similar al seleccionado para evaluar los efectos del TCS luego de un período corto de exposición. Consistió en un bioensayo *in vivo* en el que los peces sexualmente maduros se expusieron a TCS a través de un sistema de flujo continuo, con aireación constante y alimentados *ad libitum* 2 veces al día. En la Figura. 18 se resume el diseño experimental utilizado.

Se ensayaron 4 tratamientos durante 21 días: Control, Control solvente (CtrlSv) y dos concentraciones de TCS; una de ellas fue $80 \mu\text{g L}^{-1}$ y estuvo basada en efectos de disrupción endócrina previamente informados en *D. rerio* expuestos a TCS (Foran et al. 2000; Raut y Angus, 2010) y $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS (concentración basada en los valores esperables de aguas receptoras) (Dann y Hontela, 2011). Luego del periodo de exposición, los peces fueron anestesiados en frío, se midieron y pesaron. Se tomó una muestra de sangre y luego se los sacrificó por escisión en la cabeza y se extrajeron hígado, branquias, cerebro y músculo. Las muestras se conservaron en freezer $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del procesamiento.

Se evaluó la respuesta inmune a través del recuento diferencial de leucocitos y las reservas energéticas (contenido de lípidos y proteínas) en hígado y músculo. En hígado, branquias y cerebro se evaluaron: la actividad de GST, CAT, SOD, los niveles de TBARS y ACAP. La actividad de AChE fue evaluada en cerebro. Asimismo, se evaluó la expresión génica en hígado (*nrf2*, *cyp1a1* y *gst pi*) y cerebro (*cyp19b*).

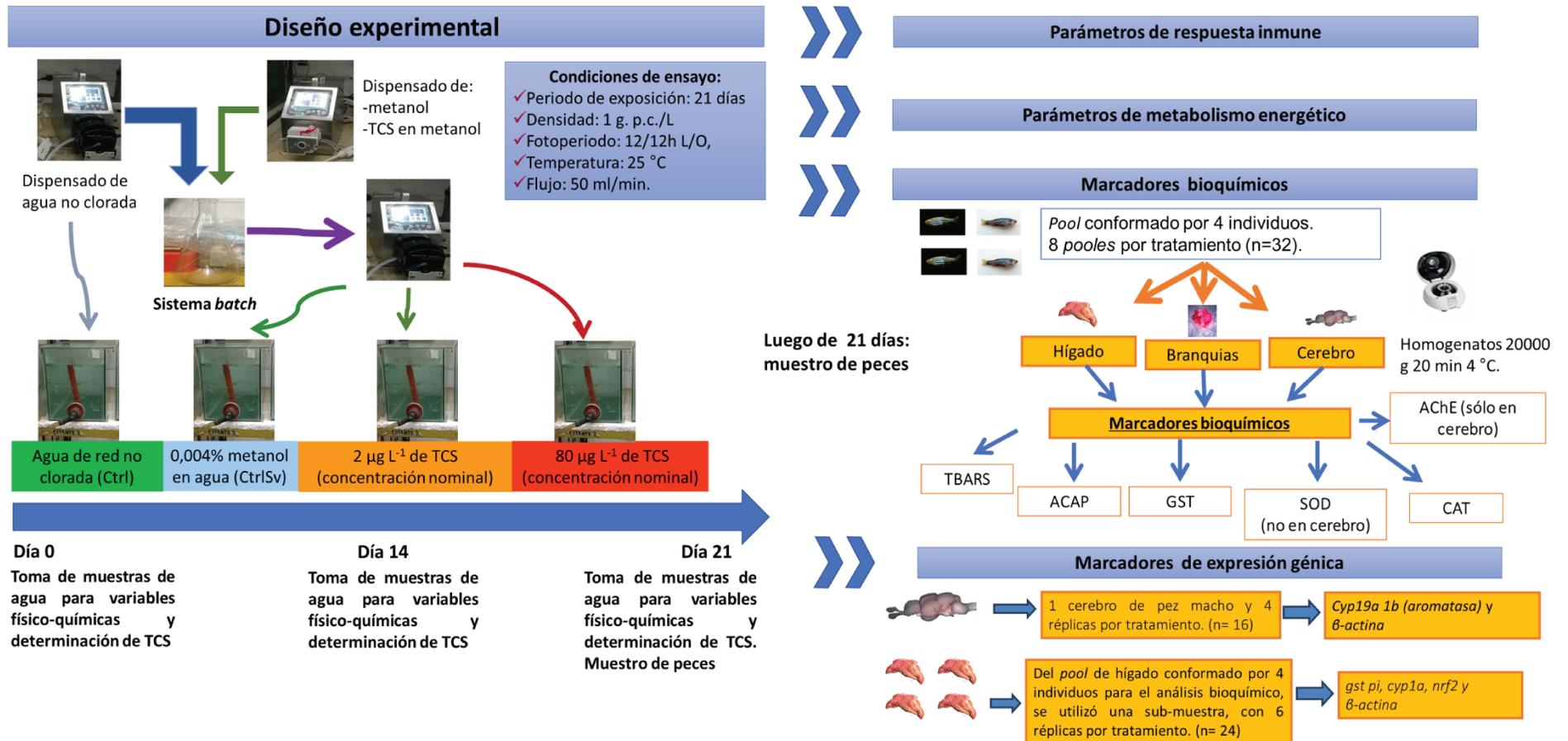


Figura 18. Diseño experimental del bioensayo prolongado con organismos adultos de *D. rerio* luego de 21 días de exposición a 2 concentraciones subletales a TCS. Para mayores detalles del sistema de flujo continuo que alimentaba las peceras ver sección 5.2.1 del capítulo II.

6.2.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos

Con el objetivo de mantener las variables fisicoquímicas del agua en condiciones apropiadas y constantes para los organismos de *D. rerio*, durante el tiempo de exposición se midieron oxígeno disuelto (OD), pH y conductividad con una sonda multiparamétrica Hach (HQ30D) por triplicado. Los datos se tomaron tres veces durante el período de ensayo (0, 14 y 21 días).

6.2.3 Preparación de muestras biológicas

La metodología para el procesamiento y obtención de los homogenatos de los diferentes tejidos (hígado, cerebro y branquias) se realizó según lo descrito en la sección 5.2.2, capítulo II. La fracción sobrenadante de los homogenatos se utilizó para la determinación de los biomarcadores.

6.2.4 Determinación de parámetros biomarcadores

6.2.4.1 Parámetros morfométricos

Se determinó el factor de condición (FC) según Bagenal y Tesch (1978) utilizando la siguiente ecuación: $FC = [\text{peso corporal (g)} / \text{longitud total}^3 (\text{cm}^3)] \times 100$.

Asimismo, se estimó el índice hepatosomático (IHS) de acuerdo con Sloof et al. (1983) utilizando la siguiente fórmula: $IHS = [\text{peso hígado (g)} / \text{peso corporal (g)}] \times 100$.

6.2.4.2 Inmunológico: frecuencia leucocitaria

La determinación de frecuencia leucocitaria se realizó a partir de dos extendidos sanguíneos por pez, los cuales fueron coloreadas con May Grunwald-Giemsa. La fórmula leucocitaria se estimó a partir del conteo diferencial de 100 glóbulos blancos por frotis,

estableciéndose el porcentaje de cada componente celular (linfocitos, monocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos) (Cazenave et al. 2009). Para la obtención de los extendidos, se realizó un corte a la altura del pedúnculo caudal del pez y con un capilar se extrajo la sangre, la cual se extendió sobre un portaobjeto y conservó hasta el momento de su coloración.

6.2.4.3 Metabólico: reservas energéticas

Las reservas energéticas se estimaron en términos de contenido de lípidos y proteínas en tejido hepático y muscular. Los lípidos totales se extrajeron mediante la utilización de una solución constituida por cloroformo y metanol (relación 2:1 v/v) (Folch et al. 1957). Luego, se procedió al lavado del extracto lipídico con una solución salina y se removieron los fosfolípidos por adsorción con ácido silícico. El dosaje de triglicéridos se realizó por saponificación de los mismos con KOH etanólico y posterior oxidación del glicerol con peryodato. El formaldehído producido se hizo reaccionar con ácido cromotrópico y la intensidad de color del producto generado se midió a 570 nm de longitud de onda. Se utilizó trioleína como estándar.

Para la determinación del contenido de proteínas se utilizó el método del Fenol de Folin, modificado por Lowry et al. (1951), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

6.2.4.4 Estrés oxidativo, daño oxidativo y biotransformación

La actividad de la GST y el contenido de TBARS y de ACAP se estimaron según lo descrito en el capítulo I, sección 3.2.4. La determinación de la actividad de la CAT y SOD se determinaron según lo descrito en el capítulo II, sección 5.2.3.

6.2.4.5 Neurotoxicidad: AChE

La actividad de AChE (EC 3.1.1.7) se midió en homogenatos de cerebro, a 414 nm de longitud de onda, según Ellman et al. (1961) modificado para la medición en microplacas. La actividad enzimática se determinó usando acetil tiocolina (0,75 μ M) como sustrato y ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB 0,01 M) en un medio de reacción que contiene un tiol específico como indicador de formación del producto. La actividad AChE fue expresada como nmoles de sustrato hidrolizados por minuto por mg de proteínas totales.

6.2.5 Biomarcadores de expresión génica vinculado a respuestas de estrés oxidativo, biotransformación y disrupción endócrina

Para responder al objetivo concerniente a los cambios en la expresión génica en *D. rerio* luego de la exposición a TCS, se verificó la eficacia de los cebadores (*primers*) para cada gen. A partir de cinco muestras de hígado y cuatro de cerebro de individuos de *D. rerio* no expuestos (control), se extrajeron el ARN y se obtuvieron los ADNc (ADN copia). A partir de los productos de PCR, se realizaron la ligación y transformación de bacterias. Asimismo, se realizó la curva de calibración para cada gen a evaluar y posteriormente se realizaron las RT-qPCR.

Luego de la verificación de los productos de amplificación, muestras y curvas de calibración, se extrajeron 6 muestras de hígado y 4 de cerebro de peces expuestos a los cuatro tratamientos mencionados anteriormente (Ctrl, CtrlSv, 2 μ g L⁻¹ de TCS y 80 μ g L⁻¹ de TCS).

A partir de la búsqueda de bibliografía y posterior verificación de las secuencias en *GenBank*, en la Tabla 3. se presentan los *primers* para la obtención de los genes de interés.

Tabla 3. Secuencia de *primers* utilizadas en el presente estudio.

Nombre del gen	Secuencia de <i>primers</i> (5'-3') F: <i>forward</i> ; R: <i>reverse</i>	Fuente	Producto de PCR *	Nº de acceso <i>genbank</i>
<i>β-actina</i>	F: CAGACATCAGGGAGTGATGG R: ATGGGGTATTTGAGGGTCAG	Muncke y Eggen (2006)	100	AF057040.1
<i>nrf2</i>	F: CCACCTTCCACTGATCTCATG R: CATTGGCATGTTGAGGCAC	Ni <i>et al.</i> , (2019)	138	AB081314
<i>gstpi</i>	F: CGGATTCCTGGTTGGCG R: TGCCATTGATGGGCAGTTT	Zhang <i>et al.</i> , (2010)	163	NM_131734.3
<i>cyp1a</i>	F: TGCCGATTCATCCCTTCC R: TTCGGTCTTCGAGTGGTTGA	Bugiak y Weber (2009)	179	NM_131879.2
<i>cyp19b</i>	F: AAAGAGTTACTAATAAAGATCCACCGGTAT R: TCCACAAGCTTCCCATTTCA	Sawyer <i>et al.</i> , (2006)	148	AF226619

*El producto de PCR (cada amplicón del gen) se expresa en cantidad de pares de bases (pb).

Con el objetivo de garantizar que las muestras no se contaminen con material genético extraño, se esterilizaron previamente los elementos a utilizar y las muestras se guardaron en TRIzol (*TransZol*, comercializado por AP-Biotech) a -80 °C hasta el momento del procesado.

Para la extracción del ARN se siguió el protocolo TRIzol que se describe a continuación. Las muestras guardadas fueron homogeneizadas bajo campana y sobre hielo con TRIzol en una relación 1 mg de tejido (cerebro/hígado) -40 µL de TRIzol. En la Figura 19 se muestran los pasos para la extracción del ARN.

Luego del homogenizado, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se agregaron 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol y se agitaron los tubos vigorosamente durante 30 segundos. Las muestras se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego los tubos fueron centrifugados a 10.000 *g* durante 10 min a 4 °C. La fase superior acuosa incolora conteniendo el ARN, fue transferida a un eppendorf nuevo. El ARN fue precipitado por agregado de 500 µL de isopropanol por mL

de TRIzol y fue mezclado por inversión suave. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, fueron centrifugadas a 10.000 *g* durante 10 min a 4 °C, obteniéndose un precipitado correspondiente al ARN. Se descartó el isopropanol por inversión y se resuspendió el pellet con vórtex con 1 mL de etanol 70%. Las muestras fueron agitadas en vórtex y centrifugadas a 7500 *g* durante 10 min a 4 °C. Luego de descartar el sobrenadante los tubos fueron colocados abiertos a 37 °C a fin de eliminar el exceso de etanol. Luego, el ARN fue disuelto en 40 µL de agua libre de nucleasas y se incubaron a 55-60 °C durante 10 min.

Luego se midieron las concentraciones y calidad del ARN en *NanoDrop*, con la relación de absorbancia: A260/280 y A260/230. La relación 260/280 debe variar entre 1,6 y 2 para que pueda considerarse que el ARN extraído tiene suficiente pureza. Las muestras de ARN se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

6.2.5.1 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo final

Una vez verificada la integridad del ARN extraído, se procedió a su transformación en ADNc por reacción de retrotranscripción. Para ello, se utilizó la enzima retrotranscriptasa M-MLV RNasa H⁻ siguiendo el protocolo de *Trans EasyScript Reverse transcriptase* (comercializado por AP-Biotech). Se preparó la mezcla de reacción, siempre trabajando en frío, según Tabla 4. para n+1, donde n es el número total de muestras.

Tabla 4. Componentes de la mezcla para la retrotranscripción de muestras de hígado y cerebro de *D. rerio*.

Componentes de la mezcla	1 eppendorf para muestra de hígado (μl)	1 eppendorf para muestra de cerebro (μl)
Oligo (dT) 0,5 (μg/μl)	1	1
Muestra de ARN	1	5
Buffer Easy Script RTx5	4	4
dNTPs (10 mM)	1	1
Enzima M-MLV EasyScript (5 U/μl)	1	1
Agua libre de nucleasas	12	8
Volumen final de reacción	20	20

A continuación, las mezclas de reacción se incubaron a 42 °C (temperatura óptima de reacción de la enzima) por 60 min, y luego fueron colocadas a 85 °C por 5 seg para la inactivación de la misma. El ADNc obtenido se conservó a -20 °C hasta el momento de su uso.

Con el objetivo de corroborar la integridad de las muestras de hígado y cerebro, así como la amplificación de los genes de interés, se realizaron las pruebas de PCR en tiempo final. Trabajando sobre hielo y en flujo laminar, se preparó la mezcla de reacción para cada reacción de PCR por gen, en eppendorf de 0,5 para $n+2$ eppendorf (n = número de muestras a amplificar).

Para cada reacción de PCR se utilizaron 5 μL de ADNc de muestra con volumen final 25 μl. Los tubos fueron colocados en un termociclador con el siguiente programa:

Iniciación: 95 °C por 2 min.
 Desnaturalización: a 95 °C por 30 segundos.
 Hibridación o *annealing*: a 47 °C por 30 segundos
 Elongación: 72 °C por 30 segundos
 Finalización: 72 °C 5 min hasta llegar a 16 °C.

Se preparó un gel de agarosa 2,5 % en buffer TAE (Tris HCl 13,3 mM pH 7,6, 6,67 mM ácido acético glacial, 0,33 mM EDTA), con 1 μL de bromuro de etidio (permite visualizar el ADN) para la posterior visualización de las bandas de ADNc. Las muestras fueron

sembradas y sometidas a electroforesis en una cuba horizontal (Labnet) utilizando buffer TAE como buffer de corrida. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 90 voltios hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel.

Las muestras se consideraron integras al observarse las bandas únicas correspondientes a β -actina y para cada gen, según el producto de PCR (amplicón). En la Figura 20. se muestran las bandas correspondientes a los amplicones (en pares de bases) de todos los genes evaluados, verificándose la eficacia de los *primers* e integridad de las muestras.

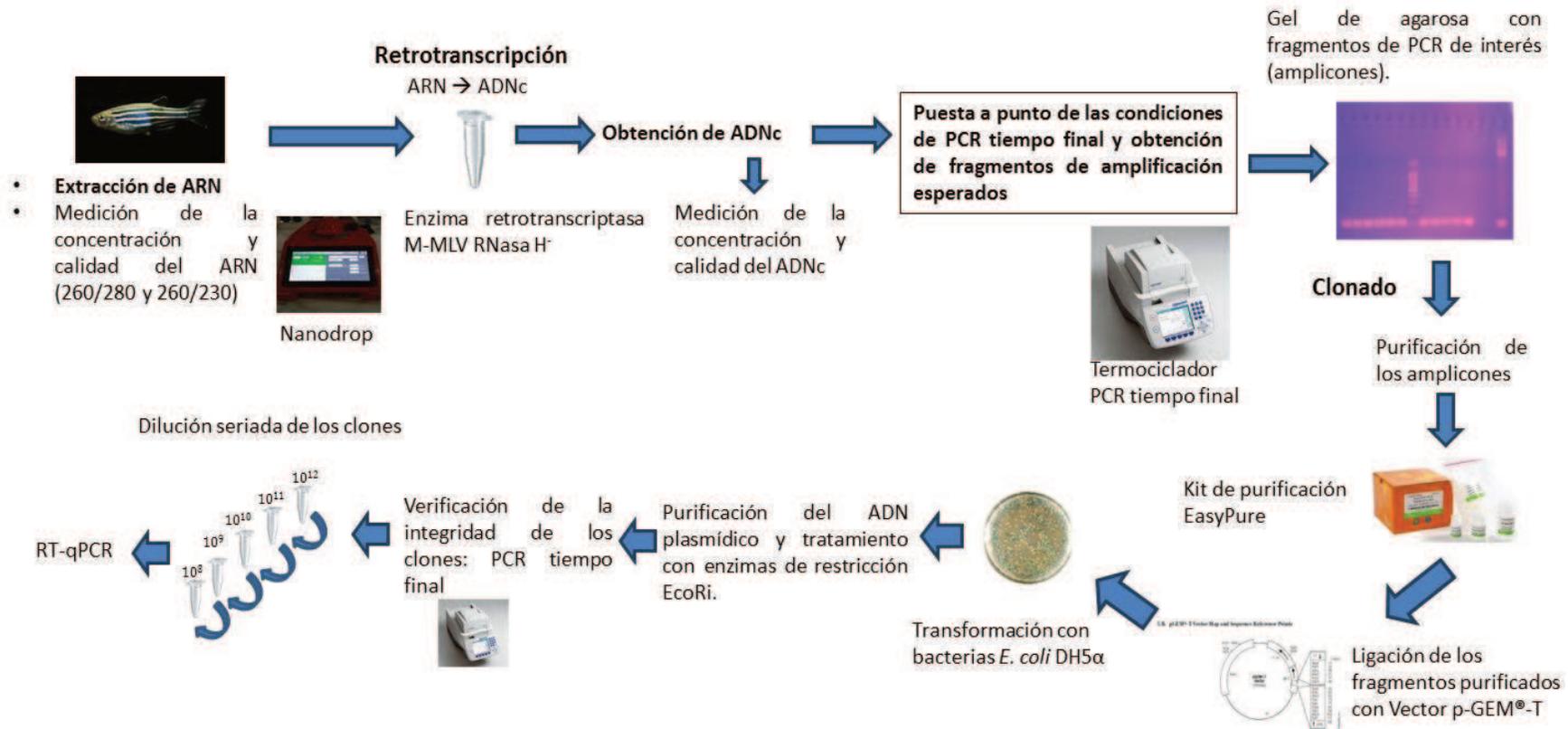


Figura 19. Esquema que representa los pasos para la obtención de ADNc, verificación de los fragmentos esperados, así como de clones de cada gen para realizar las curvas de expresión génica por RT-qPCR.

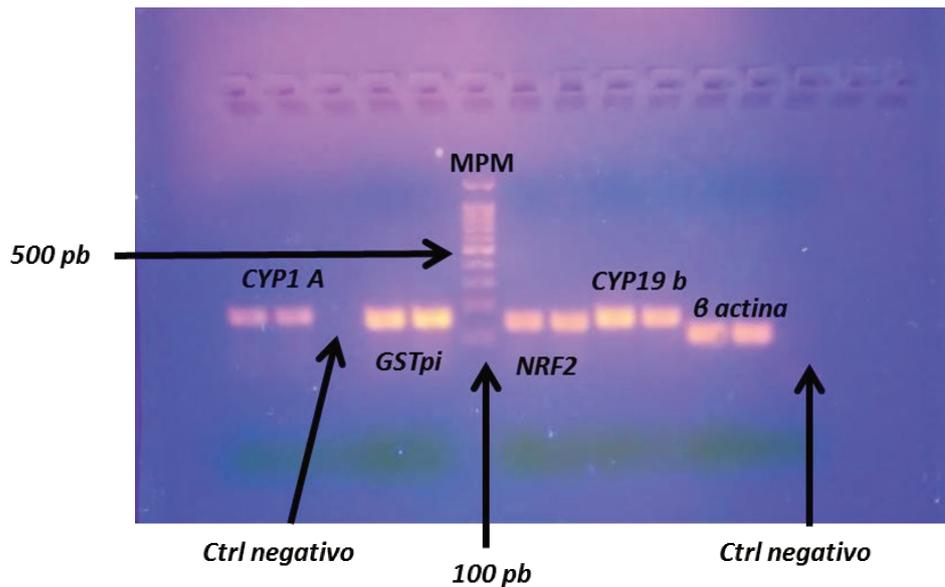


Figura 20. Producto de PCR tiempo final (amplicones) de los genes evaluados. MPM: marcador de peso molecular con una banda de 500 pb y separación entre bandas de 100 pb.

Con el fin de conocer el rango de expresión dentro del cual se expresa cada gen y la eficiencia de reacción de RT-qPCR, se realizaron curvas de calibración para cada uno de los genes de interés. A continuación, se describen los pasos a seguir para su obtención.

6.2.5.2 Purificación, ligación y transformación de bacterias

Luego de corroborar la integridad de las muestras para todos los genes de interés (*beta-actina*, *nrf2*, *gstpi*, *vtg*, *cyp1a* y *cyp19b*) se realizó la corrida electroforética en las mismas condiciones descritas anteriormente, para dos muestras por cada gen. A partir del gel de agarosa obtenido, se procedió a retirar la banda con un bisturí y se extrajo el ADNc del gel. Para ello se utilizó el kit comercial: *EasyPure Quick Gel extraction* (comercializado por AP-Biotech). La banda de gel con el material de ADNc se pesó y colocó en eppendorf, se agregó buffer gel de solubilización (GSB) en relación 3:1 de muestra para diluir el gel. Luego se incubó a 55°C por 10 min y una vez que el gel de agarosa estuvo totalmente disuelto se transfirió a una columna de spin y se centrifugó a 10.000 *g* por 1 min, descartando el líquido que atravesó la columna. En la columna se agregó 650 μ L de

buffer de lavado de ADN y se centrifugó a 10.000 *g* por 1 min, y se descartó el líquido remanente. Luego se pasó la columna a un eppendorf limpio y se agregaron 50 μ L de buffer de elución y se centrifugó a 10.000 *g* por 1 min para obtener el ADNc eluido. Una vez obtenido el ADNc se realizó la ligación con pGemT y transformación de bacterias competentes.

Para la ligación y transformación se utilizó kit Promega con ligeras modificaciones en los volúmenes. A partir del producto de PCR purificado, en un eppendorf por cada gen y por duplicado se realizó la siguiente mix: PCR producto purificado 4 μ l; buffer 2X 5 μ l, pGEM T 0,5 μ l; T4 ADN ligasa 0,5 μ l; Vf = 10 μ l.

La mix se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego, con el objetivo de aumentar la eficiencia de ligación se dejó a 4 °C por 24 horas.

6.2.5.3 Transformación de bacterias *E. coli* DH5- α competentes

Con el objetivo de obtener un mayor contenido de cada uno de los genes de interés, se llevaron a cabo la transformación de bacterias que permiten la replicación de un número elevado de copia de cada gen. Se utilizaron bacterias *E. coli* DH5- α competentes para la transformación. En un eppendorf se colocaron: 5 μ l del producto de ligación, 70 μ l de células competentes y se dejó en frío por 30 min. Luego se agregó 950 μ l de medio LB (caldo de lisogenia) se utilizó para la transformación de las bacterias.

Para realizar la transformación de las bacterias se utilizó un kit Promega con modificaciones en el volumen y células competentes de *E. coli* DH5- α en eppendorf con la ligación previamente realizada. El último paso para obtener mayor contenido del gen fue la purificación del ADN plasmídico según el método de Birnboim y Doly (1979) con ligeras modificaciones. Posteriormente, con el objetivo de obtener el inserto (gen de interés) “limpio” se trataron con la enzima de restricción EcoRI a partir de 8 colonias.

Luego de los pasos mencionados, se verificó la integridad de los clones obtenidos, mediante PCR tiempo final con las mismas condiciones mencionadas en la sección 6.2.5.1.

Finalmente, de los clones que se obtuvieron de cada gen, se realizaron diluciones seriadas de cada uno de ellos, en el rango de 10^{12} hasta 10^2 moléculas de cada gen, con el objetivo de realizar la curva de calibración.

6.2.5.4 Estimación de RT-qPCR

Para las reacciones de RT-qPCR se utilizó la Mix Mezcla Real de Byodinamics y el termociclador de tiempo real Applied Biosystems StepOne™. Las reacciones se hicieron en *strips* de 8 tubos cada uno (MicroAmp, Applied Biosystems). El programa de ciclado fue:

Iniciación: 95 °C por 2 min.

Desnaturalización: a 95 °C por 30 segundos.

Hibridación o *annealing*: a T° de hibridación de cada gen, por 30 seg.

Curva de *melting* de cada gen (para el chequeo de cada amplicón).

Para el análisis de los datos de la curva de calibración (Figura 21) se utilizó el *software* StepOne v2.3. Para el análisis de las RT-qPCR, se utilizó el valor umbral del número de ciclos (Ct), el cual se define como la cantidad de ciclos necesarios que presenta una muestra con el gen *target* para superar el umbral de fluorescencia (en un ensayo de cuantificación, se detecta en cada ciclo de amplificación la fluorescencia emitida por el complejo ADN-fluoróforo, la cual será proporcional a la cantidad de amplicón producido). Debido a que la fluorescencia es proporcional a la concentración de ADNc, cuanto mayor concentración de cDNA *target* presente la muestra, menor número de ciclos se necesitarán para superar el valor umbral, y por lo tanto menor será el valor de Ct.

Las expresiones transcripcionales se evaluaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y las muestras se realizaron por duplicado técnico. A continuación describe la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para el cálculo del nivel relativo de expresión:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra tratada}) - \Delta Ct (\text{muestra control solvente})$$

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen de interés}) - Ct (\beta\text{-actina})$$

La determinación de la eficiencia de reacción y valor de Ct para cada muestra se calculó con el *software* libre LinRegPCR (2014.x), que permite evaluar las curvas de amplificación por separado.

Los resultados se expresaron como la tasa de cambio relativo al CtrlSv (valor = 1). Valores mayores a 1 indican sobreexpresión y valores menores a 1 significan subexpresión. Para la determinación de diferencias estadísticas se utilizó el *software* libre fgStatistics (Di Rienzo et al. 2009).

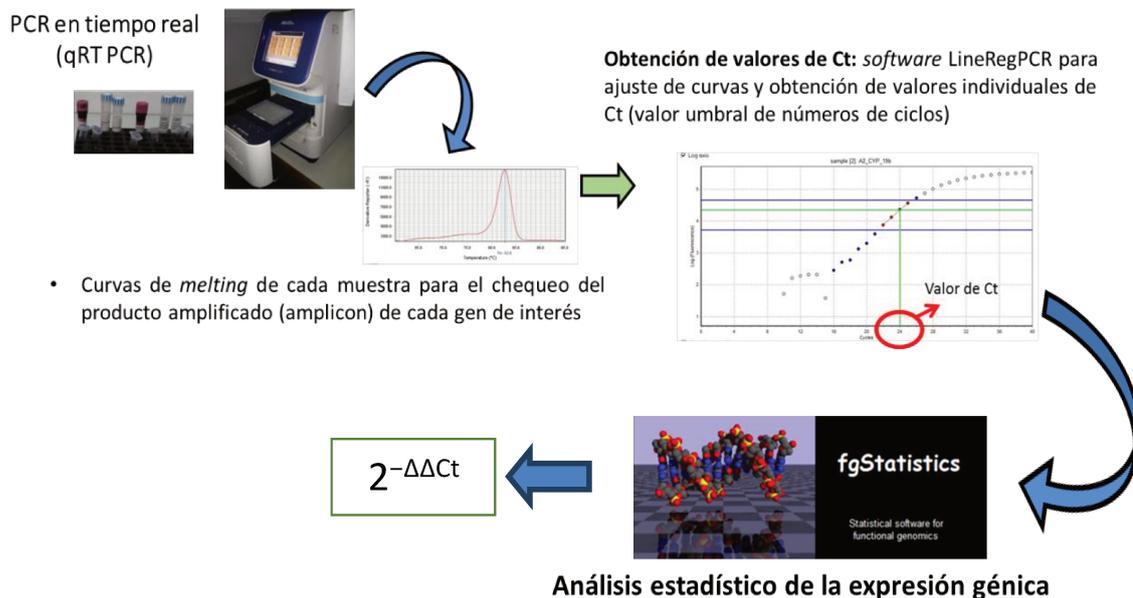


Figura 21. Pasos para la obtención y análisis de datos de la RT-qPCR.

6.2.6 Mediciones analíticas del TCS en agua

Para la determinación de las concentraciones de TCS, se tomaron muestras de agua de cada tratamiento en distintos momentos del ensayo (0, 14 y 21 días, $n = 12$). La metodología fue descrita en la sección 5.2.4, capítulo II.

6.2.7 Análisis estadístico

Se analizó la normalidad de los datos y homogeneidad de las varianzas mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias significativas entre los tratamientos se evaluaron mediante ANOVA de una vía y para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Asimismo, se realizó un ACP que incluyó a los 3 órganos, 4 tratamientos y 18 variables. Para ello se utilizó el método de Legendre y Legendre (1979) descrita en sección 5.2.5 de análisis multivariado en capítulo II.

6.3 Resultados

6.3.1 Parámetros fisicoquímicos y concentraciones efectivas de TCS

En relación con la exposición prolongada (21 días) de organismos adultos de *D. rerio* a TCS, en la Tabla 5 se muestran las variables fisicoquímicas y las concentraciones efectivas del compuesto. Estas últimas, fueron similares a las concentraciones ambientales ($3 \mu\text{g L}^{-1}$) y de afluentes de plantas de tratamiento ($60 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla 5. Variables fisicoquímicas y concentraciones efectivas de TCS en bioensayo prolongado de 21 días.

	Oxígeno disuelto (mg L^{-1})	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Concentración efectiva de TCS ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ctrl	$8,0 \pm 0,6$	$8 \pm 0,4$	$1000,0 \pm 5,0$	No detectado
CtrlSv	$7,1 \pm 0,2$	$8,4 \pm 0,1$	$1005,0 \pm 8,0$	No detectado
$2 \mu\text{g L}^{-1}$ (nominal)	$7,6 \pm 1,4$	$8,5 \pm 0,1$	988 ± 4	$3,3 \pm 1,8$
$80 \mu\text{g L}^{-1}$ (nominal)	$7,0 \pm 0,4$	$8,5 \pm 0,1$	997 ± 5	$60,3 \pm 20,0$

Los valores se presentan como la media \pm desvío estándar.

6.3.2 Parámetros morfométricos

En la Tabla 6. se muestran los valores obtenidos para FC e IHS de *D. rerio* luego de 21 días de exposición a 3 y $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. No se observaron diferencias significativas entre los peces expuestos a TCS y los grupos control para FC e IHS.

Tabla 6. Índices morfométricos de *Danio rerio* luego de 21 días de exposición a dos concentraciones subletales de TCS.

	21 días			
	Ctrl	CtrlSv	$3 \mu\text{g L}^{-1}$	$60 \mu\text{g L}^{-1}$
FC	$1,2 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,3$
IHS	$2,0 \pm 0,7$	$2,1 \pm 0,9$	$1,9 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,5$

Los valores se expresan como medias \pm desvío estándar.

6.3.3 Biomarcador inmunológico: frecuencia leucocitaria

En la Tabla 7 se muestran los valores de frecuencia leucocitaria de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Respecto al grupo CtrlSv, los organismos expuestos a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS evidenciaron una disminución significativa de linfocitos (24%) y un aumento de neutrófilos (500%). No se observaron diferencias en la frecuencia de monocitos y eosinófilos entre los grupos tratados con TCS y grupo CtrlSv. Asimismo, no se observaron basófilos en los tratamientos evaluados.

Tabla 7. Frecuencia leucocitaria (en %) de *D. rerio* luego de 21 días de exposición a dos concentraciones de TCS.

Frecuencia leucocitaria (%)	Ctrl	CtrlSv	$3 \mu\text{g L}^{-1}$	$60 \mu\text{g L}^{-1}$
Linfocitos	86 ± 8	86 ± 7	85 ± 6	$65 \pm 6^*$
Neutrófilos	5 ± 3	6 ± 3	7 ± 3	$25 \pm 6^*$
Eosinófilos	5 ± 4	6 ± 2	5 ± 3	8 ± 5
Monocitos	3 ± 2	2 ± 2	3 ± 1	2 ± 1

Los valores se expresan como medias \pm desvío estándar. *Representan diferencias significativas con el grupo CtrlSv ($p < 0.05$).

6.3.4 Biomarcador metabólico: reservas energéticas

En relación a las reservas energéticas (Tabla 8), se observó una disminución en el contenido de lípidos en hígado de los peces expuestos a ambas concentraciones de TCS (22% y 21 % en organismos expuestos a 3 y $60 \mu\text{g L}^{-1}$ TCS, respectivamente) respecto al CtrlSv. Por otro lado, el contenido de proteínas totales no evidenció cambios significativos entre los organismos expuestos a 3 y $60 \mu\text{g L}^{-1}$ TCS y el grupo CtrlSv. Finalmente, ningún grupo experimental mostró diferencias significativas en los niveles de proteínas y lípidos totales en musculo de *D. rerio*.

Tabla 8. Reservas energéticas tisulares (en hígado y músculo) de *D. rerio* expuestos a dos concentraciones subletales de TCS durante 21 días.

Reservas energéticas	Ctrl	CtrlSv	3 $\mu\text{g L}^{-1}$	60 $\mu\text{g L}^{-1}$
Hígado				
Proteínas ($\text{mg}^* \text{g tejido húmedo}^{-1}$)	133 \pm 10	138 \pm 13	143 \pm 24	138 \pm 11
Lípidos ($\mu\text{mol}^* \text{g tejido húmedo}^{-1}$)	9,1 \pm 0,8	8,7 \pm 0,3	6,9 \pm 0,4*	7,0 \pm 1,0*
Músculo				
Proteínas ($\text{mg}^* \text{g tejido húmedo}^{-1}$)	141 \pm 13	140 \pm 10	150 \pm 8	132 \pm 19
Lípidos ($\mu\text{mol}^* \text{g tejido húmedo}^{-1}$)	4,7 \pm 0,8	4,9 \pm 1,0	4,2 \pm 0,8	4,6 \pm 1,2

Los valores se expresan como medias \pm desvío estándar. *Representan diferencias significativas con el grupo CtrlSv ($p < 0.05$).

6.3.5 Biomarcadores de estrés oxidativo, biotransformación y neurotoxicidad

En la Figura 22 se muestran los valores obtenidos de los biomarcadores hepáticos en *D. rerio* luego de la exposición de 21 días a TCS. En este sentido, se observó un aumento de la actividad de la GST (13%) luego de la exposición a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ y un aumento en la actividad de la CAT (26%) en ambas concentraciones. La actividad de SOD aumentó 22 y 47% luego de 21 días de exposición a 3 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS, respectivamente. El aumento en el contenido de TBARS se registró en ambas concentraciones de TCS (28 y 18% para 3 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente) y la capacidad total contra radicales peroxilos disminuyó en organismos expuestos a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS (35%).

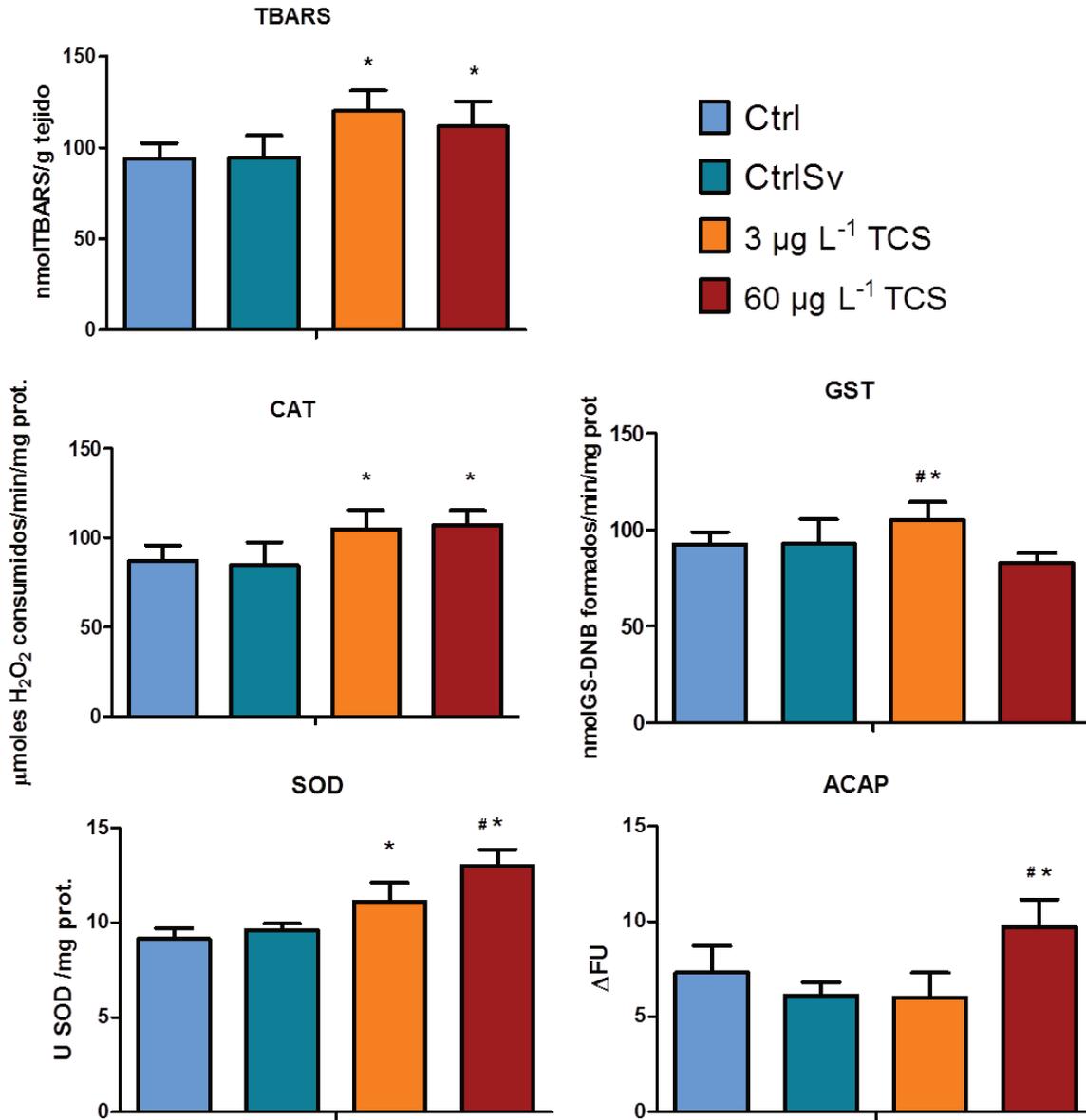


Figura 22. Biomarcadores en hígado de *D. rerio* luego de 21 días exposición a dos concentraciones de TCS. *representan diferencias significativas con el grupo CtrlSv ($p < 0.05$). ##representa diferencias significativas entre las concentraciones de TCS ensayadas. Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar.

En branquias de *D. rerio* (Figura 23) luego de 21 días de exposición se observó un aumento de la actividad de la GST (22%) en organismos expuestos a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ TCS. Asimismo, se registró una inhibición de la actividad de la CAT para ambas concentraciones (52 y 48% para 3 y $60 \mu\text{g L}^{-1}$ TCS, respectivamente). Luego de la exposición a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ TCS de TCS se observó un aumento en la actividad de SOD (51%) y daño en lípidos (47%). No se registraron diferencias significativas en ACAP en branquias entre los organismos expuestos a TCS y grupos control.

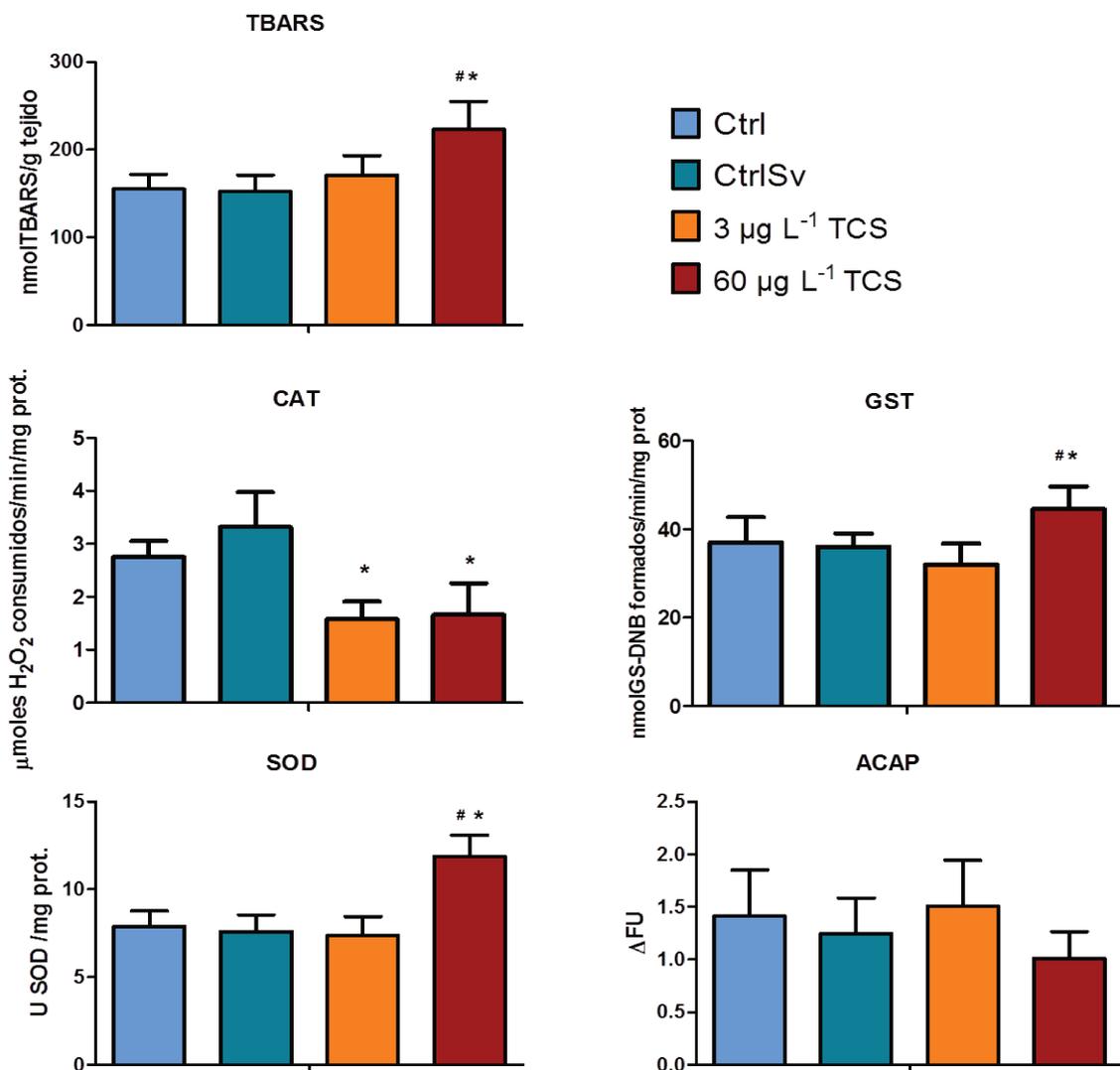


Figura 23. Biomarcadores en branquias de *D. rerio* luego de 21 días exposición a dos concentraciones subletales de TCS. *representan diferencias significativas con el grupo CtrlSv ($p < 0.05$). #representa diferencias significativas entre las concentraciones de TCS ensayadas. Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar.

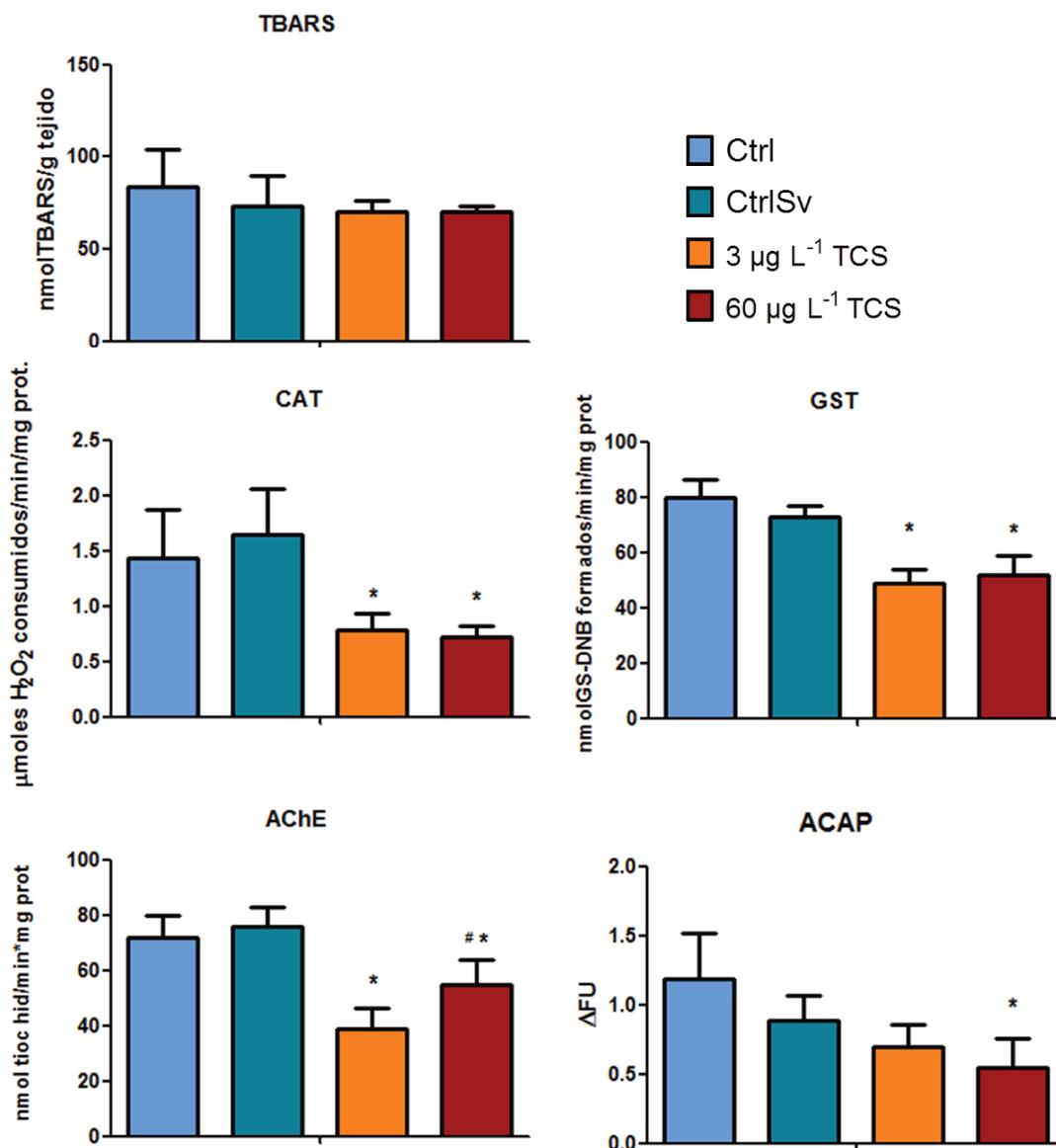


Figura 24. Biomarcadores en cerebro de *D. rerio* luego de 21 días exposición a dos concentraciones subletales de TCS. *representa diferencias significativas con el grupo CtrlSv ($p < 0.05$). #representa diferencias significativas entre las concentraciones de TCS ensayadas. Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar.

En cuanto a las respuestas de los biomarcadores en cerebro de *D. rerio* (Figura 24) se observó inhibición en la actividad de GST (34 y 29%) y CAT (50 y 56%) en organismos expuestos a 3 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS, respectivamente. Asimismo, se observó un aumento de ACAP (38%) luego de los 21 días de exposición en organismos expuestos a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS. La actividad de la AChE se inhibió en ambos grupos expuestos a TCS: 54% y 34% para 3 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, respectivamente.

6.3.6 Biomarcadores de expresión génica vinculado a respuestas de estrés oxidativo, biotransformación y disrupción endócrina

En relación al objetivo de evaluar la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante (*nrf2*, *gstpi*), de biotransformación (*cyp1a*) y de disrupción endócrina (*cyp19 b*) en *D. rerio* luego de la exposición a TCS, a continuación, se presentan los resultados obtenidos.

En la Figura 25 se muestran las curvas de calibración de RT-qPCR con los puntos de la curva (obtenidos de la dilución seriada de los clones para cada gen) y muestras control que exponen el rango en el que los genes se expresan.

En las curvas de hígado se obtuvo para *NRF2* un R^2 de 98 % y una eficiencia de reacción de 138% y el rango transcripcional de replicación fue de 10^3 a 10^6 moléculas por ciclo de reacción. Los niveles de replicación de *cyp1a* y *gstpi* de las muestras se expresaron en el rango de 10^4 a 10^8 moléculas y un R^2 99 y 99%, con eficiencias de reacción de 74% y 94%, respectivamente. En el caso de las muestras de cerebro, *cyp19b* presentó un R^2 de 98% con un rango de las muestras entre 10^2 a 10^8 y una eficiencia de reacción de 98%. β -*actina* presentó un R^2 de 99% con un rango de cantidad de moléculas del gen de interés amplificados de 10^3 a 10^8 moléculas y eficiencia de 134%. En todos los casos, los puntos de las muestras estuvieron comprendidos dentro del rango de la curva patrón.

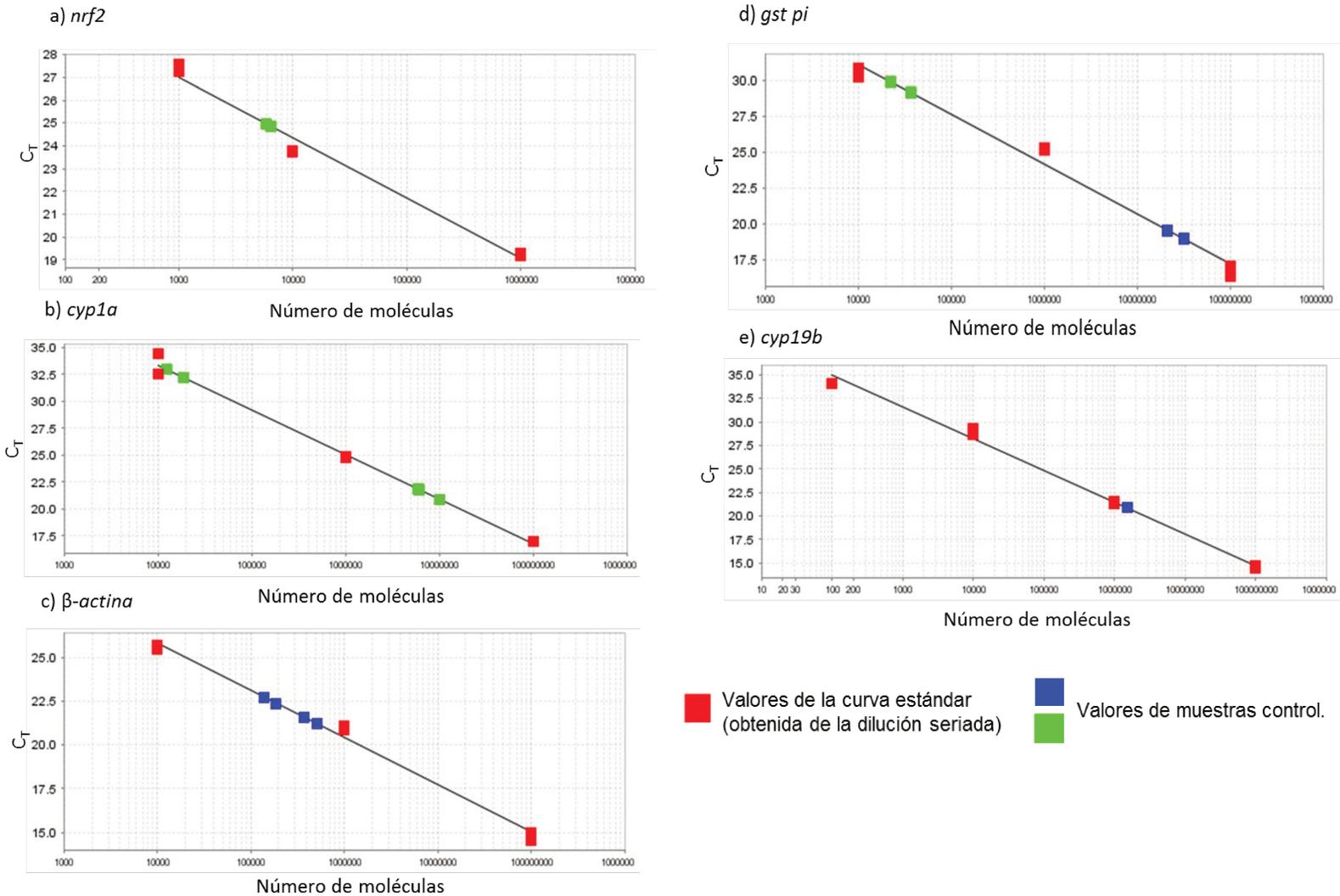


Figura 25. Curvas estándar de las RT-qPCR para cada uno de los genes de interés. C_T (valor umbral del número de ciclos) frente al número de moléculas. Los puntos rojos representan los valores de las diluciones seriadas de cada uno de los clones (amplicones) y los puntos azules y verdes corresponden a los amplicones de muestras control. a) *nrf2*, b) *cyp1a*, c) β -actina, d) *gst pi* y e) *cyp19b*.

En cuanto al gen *gst* isoforma *pi*, se observó una subexpresión en los peces expuestos a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS. Sin embargo, en organismos expuestos a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS se observó la sobreexpresión del gen luego de 21 días de exposición. En este sentido, la misma respuesta se observó en la expresión de *cyp1a* donde luego de la exposición a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS el gen se sobre-expresó y en peces expuestos a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS se observó una subexpresión significativa.

En relación a *nrf2* en hígado, se observó sobre-expresión del gen en los organismos expuestos a la menor concentración de TCS (3 $\mu\text{g L}^{-1}$) y no se observaron cambios significativos en la expresión del gen en organismos expuestos a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS.

Por último, los niveles de expresión de la aromatasa (*cyp19 b*) en cerebro de peces expuestos a TCS no mostraron diferencias significativas luego de la exposición de 21 días.

En las Tablas 9 y 10 se muestran los valores de C_t obtenidos para los genes de interés en hígado y cerebro, respectivamente luego de 21 días de exposición a TCS. En la Figura 26 se muestran los cambios a nivel de transcripción para dichos genes.

Tabla 9. Valores de C_T obtenidos por qPCR de los genes de interés en hígado de *D. rerio*.

Tratamientos	<i>nrf2</i>		<i>cyp1a</i>		<i>gstpi</i>		β <i>actina</i>	
	C_T a	C_T b	C_T a	C_T b	C_T a	C_T b	C_T a	C_T b
Ctrl	-	25,4	27,0	27,8	20,3	21,0	23,4	23,9
Ctrl	25,9	25,8	27,1	-	-	22,3	23,2	23,6
Ctrl	28,8	29,3	28,7	-	21,8	21,5	23,7	23,6
Ctrl	24,6	25,1	-	27,0	24,2	23,4	25,2	24,7
Ctrl	27,0	27,4	27,9	-	-	20,5	24,4	23,8
Ctrl	25,1	-	27,9	27,3	20,4	21,3	23,1	23,3
CtrlSv	25,8	25,9	27,8	27,8	20,7	21,1	23,4	22,9
CtrlSv	25,3	25,5	27,0	-	20,7	20,7	22,8	23,0
CtrlSv	26,0	25,9	28,3	27,4	21,4	21,4	23,2	-
CtrlSv	24,7	24,4	26,0	26,4	21,1	21,1	-	25,1
CtrlSv	25,2	25,3	26,1	26,5	21,5	21,3	25,2	25,0
CtrlSv	25,6	24,9	27,4	27,1	21,9	21,4	22,1	-
3 μ g L ⁻¹ TCS	24,1	-	26,1	25,9	-	21,7	23,4	23,9
3 μ g L ⁻¹ TCS	24,8	24,3	26,2	26,3	20,3	20,4	23,2	23,6
3 μ g L ⁻¹ TCS	23,9	24,1	-	27,3	21,5	21,7	25,2	24,7
3 μ g L ⁻¹ TCS	24,8	24,9	26,5	26,2	21,2	22,1	24,4	23,8
3 μ g L ⁻¹ TCS	24,3	-	25,5	25,8	21,2	-	23,1	23,3
60 μ g L ⁻¹ TCS	24,0	24,3	28,9	-	27,1	27,7	22,9	23,0
60 μ g L ⁻¹ TCS	24,4	24,7	32,4	32,0	27,3	27,5	22,2	22,2
60 μ g L ⁻¹ TCS	23,9	23,5	32,3	31,7	26,9	27,0	-	22,5
60 μ g L ⁻¹ TCS	25,7	26,0	32,4	-	27,9	27,7	23,0	22,8
60 μ g L ⁻¹ TCS	25,5	-	31,5	31,7	27,7	26,3	23,7	23,4

Tabla 10. Valores de C_T obtenidos por qPCR de *cyp19b* y β -*actina* en cerebro de *D. rerio*.

Tratamientos	Aromatasa (<i>cyp19b</i>)		β <i>actina</i>	
	C_T a	C_T b	C_T a	C_T b
Ctrl	23,35	23,97	-	23,38
Ctrl	23,71	23,57	23,77	24,38
Ctrl	23,53	23,24	24,68	23,18
Ctrl	22,42	22,46	23	-
CtrlSv	22,16	22,3	22,89	23,24
CtrlSv	23,7	24,26	23,57	24,04
CtrlSv	23,03	22,3	22,83	22,29
CtrlSv	27,84	27,22	24	24,9
3 μ g L ⁻¹ TCS	26,32	26,45	25,99	26,56
3 μ g L ⁻¹ TCS	27,47	28,01	25,01	25,72
3 μ g L ⁻¹ TCS	22,79	23,52	23,92	22,91
3 μ g L ⁻¹ TCS	23,51	24,19	23	-
60 μ g L ⁻¹ TCS	-	25,52	-	22,64
60 μ g L ⁻¹ TCS	25,43	25,98	25,14	25,91
60 μ g L ⁻¹ TCS	24,29	24,14	23,99	23,52
60 μ g L ⁻¹ TCS	25,83	26,73	25,88	-

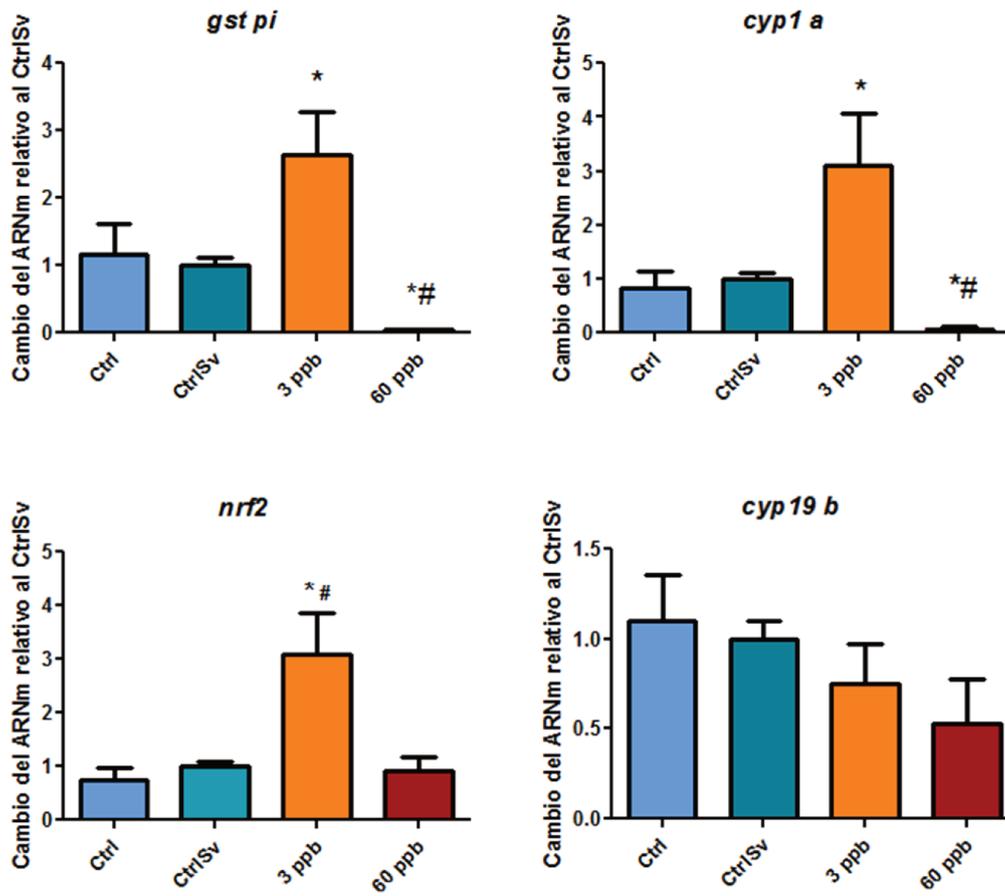


Figura 26. Expresión relativa de *GSTpi* (A), *CYP 1a* (B), *NRF2* (C) en hígado y *CYP19 b* (D) en cerebro de *D. rerio* luego de 21 días de exposición a 2 concentraciones de TCS. Los niveles de expresión de RNA fueron normalizados empleando β -actina como gen de referencia. *indica diferencias significativas respecto a CtrlSv ($p < 0,05$).

6.3.7 Análisis de componentes principales de los marcadores bioquímicos de hígado, branquias y cerebro

En la Figura 27 se muestra el ACP con los 4 tratamientos y los biomarcadores bioquímicos evaluados en todos los órganos. El ACP mostró que el 60% de la varianza total de los datos puede explicarse por los CP1 y CP2. Cuatro autovalores fueron mayores a 1, entonces los coeficientes de correlación $>0,52$ fueron los que mejor explicaron la variabilidad del ACP.

Se observó una evidente separación explicada por el CP1 (40%): por un lado, los controles (Ctrl y CtrlSv) y por el otro los grupos expuestos. En este sentido, los biomarcadores que se correlacionaron positivamente en CP1 fueron: TBARS y CAT en hígado, y TBARS y SOD de branquias. Negativamente se correlacionaron: CAT en branquias, y CAT, ACAP y AChE en cerebro. Por otro lado, los organismos expuestos se diferenciaron principalmente en el CP2 (20%), el cual estuvo explicado positivamente con parámetros evaluados en branquias (GST y SOD) e hígado (ACAP) y negativamente con TBARS y GST en hígado y ACAP en branquias.

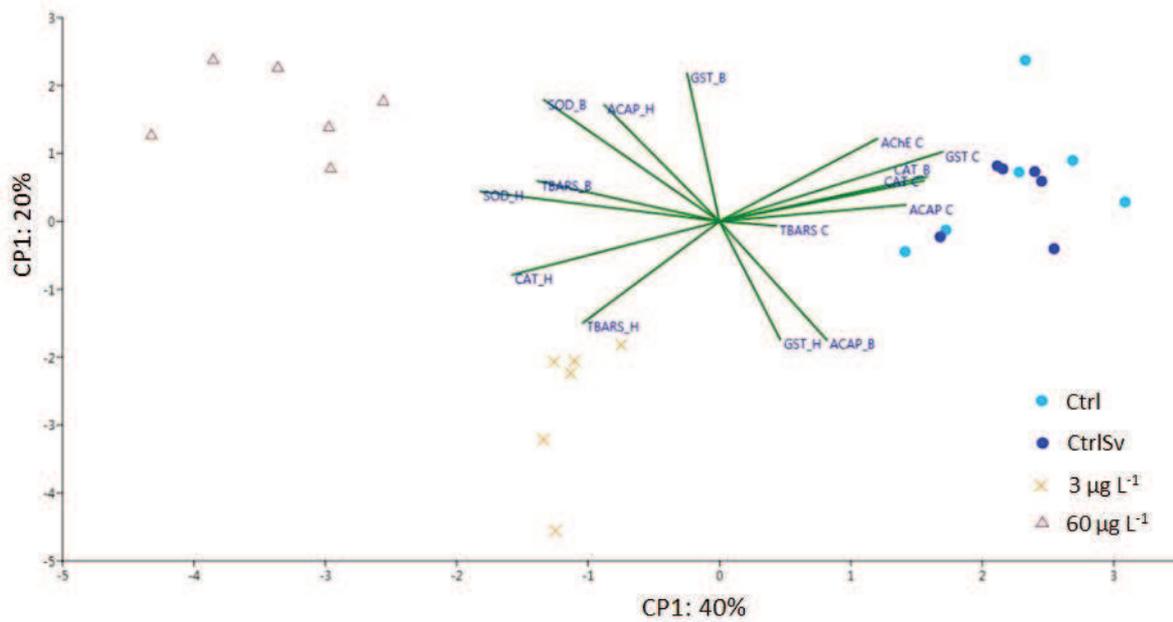


Figura 27. Análisis de componentes principales. Representación de los biomarcadores y grupos de individuos por tratamiento (cada punto representa un *pool* de organismos). Las abreviaturas de los biomarcadores están explicadas en el texto. H: hígado, C: cerebro y B: branquias.

6.4 Discusión

Si bien algunos estudios analizaron los efectos tóxicos de la exposición a TCS en peces, los mismos han evaluado sólo algunas respuestas biológicas de manera aislada (Schultz et al. 2012; Wang et al. 2017; Sahu et al. 2018; Paul et al. 2019; 2020; Gyimah et al. 2021). En este sentido, el presente capítulo es el primer estudio que incluye una evaluación que integra parámetros inmunológicos, de metabolismo energético y marcadores bioquímicos de estrés oxidativo, biotransformación y neurotoxicidad; así como de la expresión de genes involucrados en procesos de estrés oxidativo, biotransformación y disrupción endócrina en organismos adultos de *D. rerio* luego de una exposición prolongada a TCS. De esta manera, se logra una mayor comprensión de los efectos tóxicos promovidos por el TCS.

6.4.1 Parámetros morfométricos

La aptitud individual y los cambios a largo plazo en la salud de los peces se pueden evaluar a través de los índices morfométricos de FC y IHS, los cuales suelen estar correlacionados con la calidad del agua (Goede y Barton, 1990). Particularmente, los efectos tóxicos en el hígado pueden estar directamente relacionado con un cambio en el tamaño hepático como consecuencia de la presencia de un agente tóxico (Sancho et al. 2010). En el presente estudio, se observaron FC e IHS sin cambios significativos entre los grupos, lo que sugiere que los peces presentaron un estado general normal durante el periodo experimental. Por otra parte, los resultados indican que las concentraciones testeadas y el tiempo de exposición no fueron suficientes para provocar cambios en estos biomarcadores en *D. rerio*.

6.4.2 Parámetros de respuesta inmune

Se evidenciaron cambios en la frecuencia leucocitaria promovida por el TCS en organismos expuestos a $60 \mu\text{g L}^{-1}$. En particular, se produjo una disminución del porcentaje de linfocitos y un aumento en el número de neutrófilos. Burgos-Aceves et al. (2021) explican que los compuestos orgánicos pueden actuar como agentes inmunogénicos a través de varios mecanismos. Pueden alterar la actividad de los linfocitos generando una respuesta autoinmune; o bien pueden promover una reactividad inmunitaria excesiva, provocada por una activación generalizada de células (tales como macrófagos y granulocitos) a través de la secreción de moléculas inflamatorias (Burgos-Aceves et al. 2021). En este sentido, los neutrófilos proliferan en circulación en respuesta a infecciones, inflamación y estrés, y cumplen funciones de reconocimiento y eliminación de células o microorganismos. Los resultados obtenidos muestran que luego de la exposición a TCS, los peces serían menos eficientes para contrarrestar y/o reconocer agentes patógenos, aumentando las probabilidades de infecciones/enfermedades, mientras que el aumento de neutrófilos promovería respuestas inflamatorias. Xu et al. (2018) observaron un aumento en el número de neutrófilos en larvas de *D. rerio* expuestas a 17β -estradiol, bisfenol-A y nitrofenol durante 24 h. Respuestas inflamatorias y de inmunotoxicidad semejantes también fueron observadas en *Cyprinus carpio* luego de exposiciones prolongadas a bisfenol-A, el cual es químicamente similar al TCS (Qiu et al. 2016 y Gu et al. 2021).

6.4.3 Parámetros de metabolismo energético

La distribución energética en peces expuestos a un estresor se encuentra alterada y muchas veces las reservas tisulares deben ser utilizadas para los procesos de detoxificación y restablecimiento de la homeostasis. Estos mecanismos compensatorios determinan en gran medida la tolerancia del pez a situaciones de estrés ambiental

(Fantón et al. 2021; Petitjean et al. 2019). En los vertebrados, el metabolismo de los lípidos juega un papel importante en la reproducción y desarrollo (Ho et al. 2016). Además, son fuente de energía dado que al descomponerse, los triglicéridos producen ácidos grasos y glicerol que permanecen accesibles para la síntesis de energía y glucosa (Fantón et al. 2021). Por otra parte, el hígado es el principal órgano involucrado en el metabolismo energético y desintoxicación de xenobióticos. La disminución en el contenido hepático de lípidos observada en nuestros resultados evidenciaría que estas biomoléculas juegan un papel importante en el suministro de energía durante la exposición a TCS en *D. rerio*. En este contexto, la movilización de reservas sería un mecanismo adaptativo en respuesta al aumento de la demanda de energía (Gandar et al. 2017).

Hasta donde sabemos, hay muy poca información disponible sobre el metabolismo de los lípidos en organismos adultos de *D. rerio*. El metabolismo de lípidos ha sido evaluado en embriones de *D. rerio* luego de períodos cortos de exposición a TCS y MeTCS. Al respecto, Ho et al. (2016) observaron una acumulación de lípidos en larvas de *D. rerio* luego de la exposición durante 5 días a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, mientras que en otro estudio, Fu et al. (2019) observaron una regulación positiva de ácidos grasos luego de la exposición a MeTCS. Estos resultados sugieren que el metabolismo de los lípidos en estadios tempranos difiere al observado en adultos luego de la exposición a TCS. Esto puede deberse a que, en los estadios temprano del desarrollo, los órganos aún no se encuentran completamente diferenciados; razón por la cual la estimación de lípidos se realiza sobre todo el organismo. Nuestros resultados aportan nueva información de los efectos del TCS sobre las reservas energéticas, que fue diferente a la observada en los estadios tempranos.

6.4.4 Marcadores bioquímicos y de expresión génica involucrados en respuestas de estrés oxidativo, biotransformación y disrupción endócrina

La inducción del sistema de defensa antioxidante y las enzimas metabolizadoras de xenobióticos son las adaptaciones más importantes de los peces para evitar el daño oxidativo en caso de estrés. Además, son reconocidos como el estándar básico en estudios ambientales basados en biomarcadores (Van der Oost et al. 2003).

El hígado es el principal órgano involucrado en el metabolismo de los PCP, por lo que el estudio de los cambios promovidos en este tejido ante la exposición a TCS resulta de especial interés. En este sentido, el aumento de las actividades de CAT y SOD en hígado de los grupos expuestos a 3 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ TCS sugiere una activación de la respuesta antioxidante. Resultados similares fueron observados en hígado de *Pangasianodon hypophthalmus* luego de 15 y 30 días de exposición a 50 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS (Sahu et al. 2018). Asimismo, Paul et al. (2020) observaron un aumento en la actividad de ambas enzimas en hígado de *P. hypophthalmus* luego de 15 y 30 días de exposición a 84 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS.

El TCS puede ser biotransformado a MeTCS por enzimas de la fase II (Peng et al. 2018), por lo que una mayor actividad de éstas se relaciona con una mayor capacidad para biotransformar los xenobióticos. En este contexto, el aumento en la actividad de GST en hígado de los organismos expuestos a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, fue informado para *P. hypophthalmus* luego de 15 y 30 días de exposición a 84 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS (Paul et al. 2019). Ciertas isoenzimas de GST pueden conjugarse con metabolitos que surgen del daño oxidativo y tener la capacidad de reducir los hidroperóxidos lipídicos (Regoli et al. 2011). El aumento de metabolitos tóxicos formados durante la lipoperoxidación mediante la reacción de Fenton (Kumar et al. 2021) se evidencia con el aumento en el contenido de

TBARS, lo que puede explicar el aumento de la actividad de GST luego de 21 días de exposición a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. El daño oxidativo en lípidos hepáticos en *D. rerio* fue observado luego de 30 días de exposición a $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS (Gyimah et al. 2020). Nuestros resultados sugieren que, si bien se activaron las respuestas antioxidantes en los peces expuestos a 3 y $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, no fueron suficientes para evitar el daño en lípidos.

El aumento en la actividad de enzimas antioxidantes y de biotransformación podría explicar la ausencia de cambios en el contenido de ACAP en organismos expuestos a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Sin embargo, la disminución de la capacidad antioxidante en hígado de los organismos expuestos a la mayor concentración evidencia un desbalance que favorece el exceso de radicales peróxidos promovido por el TCS.

Los cambios relativamente rápidos promovidos por los PCP a nivel transcripcional que afectan el funcionamiento de las células, han sido de interés en los estudios ecotoxicológicos (Wang et al. 2019). En ese sentido, la evaluación de la expresión génica promovida por el TCS en peces ha sido abordada principalmente luego de períodos de exposición cortos (Bao et al. 2021; Ku et al. 2014; Liang et al. 2013; Zhang et al. 2009). Los resultados obtenidos en la presente Tesis aportan nuevos datos que permiten demostrar las alteraciones a nivel génico que produce el TCS en *D. rerio* luego de una exposición prolongada a concentraciones subletales.

La sobreexpresión de *nrf2* observada en hígado de los peces expuestos $3 \mu\text{g L}^{-1}$ evidencia una respuesta a nivel transcripcional en *D. rerio* frente al estrés oxidativo promovido por la exposición a TCS. En vertebrados, principalmente en animales adultos, Nrf2 tiene un papel clave en la mediación de la respuesta al estrés oxidativo (Hahn et al. 2015). El aumento en la expresión de *nrf2* aumenta los niveles de Nrf2 en el núcleo de las células

(previa liberación del complejo Keap1-Nrf2 del citosol), activando el sitio ARE, el cual promueve la transcripción de genes como algunas isoformas de *gst* (*gstpi*, *gsta*, *gstm*), glutatión peroxidasa (*gpx1*), superóxido dismutasas (*sod1*, *sod2*), entre otros. Bao et al. (2021) demostraron que una exposición a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS activó la vía de señalización mediada por Nrf2/ARE en hígado de *Gambusia affinis* luego de 24 y 168 h de exposición. Entre los genes *target* típicos de Nrf2 se encuentra *gst pi* (Kobayashi y Yamamoto, 2005; Hahn et al. 2015), por lo que la sobreexpresión de *nrf2* observada en hígado de peces expuestos a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ explicaría la sobreexpresión observada en *gst pi* a la misma concentración. En este sentido, resultados semejantes fueron observados en *D. rerio* expuestos a cadmio durante 24 h (Wang y Gallagher 2013). Por su parte, Liang et al. (2013) observaron que en hígado de *Xiphophorus helleri* la expresión de mRNA de GST fue mayor para las mayores concentraciones ensayadas luego de periodos cortos (24, 48 y 168 h) de exposición a TCS. Timme-Laragy et al. (2009) hallaron una sobreexpresión de genes antioxidantes incluido *gst pi* en embriones de *D. rerio* luego de 2 días de exposición a una mezcla de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Liang et al. (2013) informaron que en hígado de *X. helleri* el TCS interacciona con enzimas de la fase I y II, relacionando la toxicidad del mismo con la inducción de los niveles de expresión de los genes de la CYP1A y GST. En particular, la expresión de la *gst pi* se utiliza con frecuencia como biomarcador de exposición a productos farmacéuticos y compuestos orgánicos persistentes ya que es reconocida como parte importante del sistema de desintoxicación celular (Hayes et al. 2005; Glisic et al. 2015).

De acuerdo con nuestros resultados, el aumento de la expresión de *cyp1a* observada a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS evidencia que este compuesto promueve la activación del complejo de enzimas P450, las cuales lo biotransforman agregando un grupo funcional hidrofílico al

TCS. Si bien en la presente Tesis no se evaluaron las actividades de las enzimas de fase I, la sobreexpresión de este gen sugiere una respuesta compensatoria a nivel transcripcional de las células hepáticas luego de 21 días de exposición.

La subexpresión de *gst pi* y *cyp1a* observada en hígado luego de la exposición a la concentración más alta de TCS ($60 \mu\text{g L}^{-1}$) sugiere una pérdida en la capacidad antioxidante y de capacidad de síntesis de proteínas de fase I promovidas por el TCS. En este sentido, Zhang et al. (2009) observaron una subexpresión de *gst pi* en hígado de *D. rerio* luego de la exposición $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ a microsistina. Asimismo, Ku et al. (2014) observaron una subexpresión de *cyp1a* en hígado de *Pelteobargus fulvidraco* luego de una exposición de 72 y 168 h de exposición $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Se infiere que el TCS puede actuar como supresor de *cyp1a* a concentraciones mayores a las ambientales, en periodos cortos y prolongados, disminuyendo la capacidad de eliminación del TCS.

En muchas situaciones, la transcripción de un gen se correlaciona con la actividad de su enzima relacionada (Giuliani et al. 2013; Ku et al. 2014). Sin embargo, también puede existir una falta de sincronización relacionada con mecanismos postranscripcionales (regulación de microARN) y posttraduccionales (metilación, acetilación) que pueden afectar la actividad enzimática (Regoli et al. 2011). Como se mencionó anteriormente, la activación transcripcional de *nrf2* posibilitó la sobre expresión de *gst pi* y el aumento de la enzima GST en hígado de organismos expuestos a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Por otro lado, la falta de sincronización entre la ausencia de cambios en la actividad de GST a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS y la subexpresión reportada en el presente estudio, puede deberse a que la determinación enzimática de GST incluye otras isoformas de la enzima, lo que podría enmascarar la ausencia de inhibición. En este sentido, Liang et al. (2013) observaron que

la toxicidad del TCS en hígado de *X. helleri* a nivel transcripcional para *cyp1a* y *gst* era significativamente mayor a las actividades catalíticas de EROD y GST, respectivamente.

En relación con las branquias de los peces, los mayores cambios se observaron a la concentración más alta de TCS. Este órgano es el principal sitio de absorción de tóxicos ya que los filamentos y laminillas crean una gran superficie para el contacto directo con los contaminantes en el agua (Velmurugan et al. 2007). El aumento de la actividad GST, inhibición de actividad CAT y el daño oxidativo en lípidos observados en branquias de los organismos expuestos a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, fue similar a lo descrito por Hemalatha et al. (2019) para *Labeo rohita* luego de 21 días de exposición a 39 y $78 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS.

Si bien la actividad CAT disminuyó, y las actividades GST y SOD no mostraron diferencias significativas respecto al grupo CtrlSv, el aumento de TBARS en branquias pudo haberse prevenido en los organismos expuestos a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Otros mecanismos antioxidantes no evaluados en el presente trabajo podrían haber estado operando. Por ejemplo, los lípidos dañados en los tejidos pueden convertirse en productos inofensivos mediante mecanismos de degradación que involucran varias enzimas como las peroxidasas y las fosfolipasas (Kohen y Nyska, 2002). Este mecanismo podría conducir en última instancia a los niveles de TBARS sin cambios observados. Por otro lado, a la mayor concentración testada y luego de 21 días, las respuestas mediadas por SOD y GST no fueron suficientes para evitar el daño en lípidos.

Respecto a las evaluaciones en cerebro, si bien se observaron inhibiciones en las actividades de las enzimas antioxidantes, no se detectó peroxidación lipídica. El cerebro cuenta con un sistema de defensa antioxidante comparativamente bajo, en el que el sistema dependiente de glutatión es de gran importancia para contrarrestar la producción de ROS (Tabassum et al. 2016). Posiblemente, otros componentes de este

sistema (como las enzimas glutatión reductasa y glutatión peroxidasa) que no fueron evaluados en el presente estudio, podrían haber contribuido a mantener el equilibrio oxidativo y evitar el daño oxidativo en lípidos. Asimismo, la menor actividad de GST observada podría deberse al agotamiento del glutatión reducido y/o una interrupción de su síntesis (Lu y Gao, 2009). Alternativamente, una pérdida irreversible de actividad debido a la modificación covalente de la enzima podría haber causado la inhibición (Cazenave et al. 2006). Por último, las fluctuaciones de los radicales superóxidos podrían haber causado la inhibición de la actividad CAT en este tejido (Wilhelm, 2007; Bagnyukova et al. 2005). Nuestros resultados coinciden con lo observado en cerebro de *D. rerio* luego de 30 días de exposición a 100 y 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, con inhibición de CAT y ausencia de peroxidación lipídica (Gyimah et al. 2020). En el presente estudio, *D. rerio* mostró una respuesta tisular distinta y diferencial en relación con el estrés oxidativo y las defensas antioxidantes cuando se expuso a TCS durante 21 días.

La inhibición de la actividad de AChE da como resultado una acumulación de acetilcolina que provoca un potencial postsináptico de excitación prolongado. En la presente Tesis, se analizó la disminución de la actividad de AChE en cerebro en los peces expuestos a ambas concentraciones de TCS luego de 21 días. En este sentido, Sahu et al. (2018) reportaron una disminución luego de 15 y 30 días de exposición a 50, 100 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS en *P. hypophthalmus*. Aunque la AChE se considera un biomarcador neurotóxico específico de la exposición a organofosforados y carbamatos, varios estudios también describen una alteración de su actividad por otros compuestos en peces (Cazenave et al. 2021). En particular, la presencia de aminoácidos aromáticos en el sitio activo de la AChE crea una región hidrofóbica. Debido a la característica lipofílica del TCS puede

interactuar con el sitio activo, lo que podría causar inhibición de la actividad enzimática (Colović et al. 2013).

La disrupción endócrina ha sido reportada como uno de los efectos del TCS en peces y un biomarcador útil como indicador de la toxicidad del mismo. En este sentido, el gen *cyp19b* codifica a la proteína aromatasa, enzima clave para la biosíntesis de estrógenos. La ausencia de alteración significativa en los niveles de ARNm de *cyp19b* en cerebro de los peces luego de 21 días de exposición a TCS indica ausencia de disrupción endócrina en las condiciones ensayadas. Sin embargo, Wang et al. (2018) observaron sobreexpresión del gen en machos juveniles de *C. carpio* luego de una exposición de 42 días a 40 y 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. La ausencia de disrupción endócrina mediada por la *cyp19* podría deberse al estadio evaluado. En este sentido, Sawyer et al. (2006) observaron diferencias en la expresión de *cyp19 b* en *D. rerio*, donde la inducción del gen fue considerablemente mayor en larvas que en adultos (100 y 4 veces, respectivamente) luego de la exposición durante 5 días a 7-b-estradiol. Asimismo, los estudios que observan alteraciones han utilizado individuos machos juveniles (Wang et al. 2018; 2019), evidenciando que mientras más temprano se encuentren los organismos en la etapa de desarrollo, más susceptibles a sufrir procesos de disrupción endócrina mediada por *cyp19b*.

6.4.5 Integración de biomarcadores: Análisis de componentes principales

Las técnicas estadísticas multivariadas son enfoques eficaces para analizar grandes conjuntos de datos y pueden identificar biomarcadores responsables de distinguir grupos de organismos expuestos a diferentes factores estresantes (Rossi et al. 2017).

Diversos trabajos han utilizado enfoques que integran biomarcadores con el fin de obtener una visión global de los efectos de un contaminante (Lozano et al. 2021; Sager

et al. 2021; Ale et al. 2018). Lozano et al. (2021) demostraron la utilidad de integrar los resultados a través de análisis multivariados permitiendo una mayor comprensión de los efectos de la ivermectina en peces, así como para identificar los efectos generales de los tratamientos sobre marcadores bioquímicos y de comportamiento. Por otro lado, Ale et al. (2018) reportaron que parámetros biomarcadores hematológicos y de reservas energéticas explicaron el agrupamiento de peces tratados con nanopartículas de plata. En consecuencia, los análisis multivariados permiten identificar qué marcadores de una batería de ellos pueden explicar la separación entre tratamientos/grupos.

En el presente trabajo, el análisis integrado de los marcadores bioquímicos (ACAP, SOD, TBARS, CAT, GST y AChE) permitió separar los grupos de peces expuestos a TCS de los grupos control, evidenciando respuestas bioquímicas diferenciales entre organismos bajo estrés. En este contexto, ciertos biomarcadores mostraron mayor sensibilidad a la exposición al TCS; por ejemplo, se observaron fuertes respuestas en los niveles de TBARS, así como en la actividad de la CAT. Si bien el aumento de daño oxidativo en lípidos y los cambios en la actividad de CAT (inhibitorias y de activación) son efectos que se observan en diferentes órganos de *D. rerio*, el hígado fue el sitio más sensible y permitió separar los grupos tratados de los controles. Estos resultados confirman su papel principal en la mayoría de las vías metabólicas. La separación entre grupos de peces expuestos a 3 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS se relacionó principalmente con los biomarcadores evaluados en hígado y branquias. Los biomarcadores en branquias correlacionados positivamente con el grupo expuesto a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS indican que son un órgano sensible a concentraciones mayores de TCS, mientras que a menor concentración son los biomarcadores en hígado los más susceptibles.

Capítulo IV: Evaluación de la toxicidad en organismos adultos de *D. rerio* expuestos a sedimento enriquecido con triclosán

7.1 Introducción

En el sedimento, muchos contaminantes orgánicos se vuelven más estables y persistentes con el tiempo, aumentando sus posibles efectos adversos sobre la biota (Ronco et al. 2008, Boulanger et al. 2019). El K_{ow} es útil para determinar la afinidad de un compuesto a la fracción orgánica del sedimento y cuanto mayor es su valor, menor solubilidad en agua y más afinidad hacia los compuestos orgánicos tiene el mismo. En este sentido, el TCS presenta una baja solubilidad en agua (12 mg L^{-1}) y posee un $\log K_{ow} = 3,5-4,8$ a pH neutro, por lo tanto, presenta afinidad hacia los componentes orgánicos del sedimento.

El TCS posee una vida media de 4 a 60 días en sedimento, la cual depende de la concentración inicial y de factores ambientales como el pH, oxígeno y luz (Bedoux et al. 2012; Lindström et al. 2002) (ver sección 3.2.3 de introducción general). Sin embargo, el TCS es susceptible a la degradación a través de la fotólisis acuosa presentando una vida media de <1 hora bajo condiciones abióticas y de hasta 10 días en aguas naturales (SCCS, 2010). Por otro lado, su principal metabolito (MeTCS) tiene menor solubilidad en agua ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$) y una mayor partición octanol-agua ($\log K_{ow} = 5,34$), por lo que es más estable asociado a la materia orgánica y en sedimentos que el TCS (Balmer et al. 2005, Chen et al. 2011). Debido a su alta hidrofobicidad, se esperaría que el TCS y MeTCS se adsorban mayormente en materia orgánica y sedimentos.

Los bioensayos con sedimentos fortificados o enriquecidos (términos equivalentes) con uno más xenobióticos, son necesarios para evaluar la toxicidad de los mismos, incluidas las fases solubles y sólidas. En este contexto, debido a que el MeTCS presenta gran afinidad al sedimento, éste puede comportarse como una fuente de contaminación en el agua circundante e impactar no sólo a las especies bentónicas, sino también a las que

se encuentran en las aguas cercanas al sedimento. El mecanismo de acción de MeTCS es similar a TCS y puede ocurrir en concentraciones cuantificables e incluso cuando TCS está por debajo del límite de detección (Lindström et al. 2002). Existen estudios que han comprobado la citotoxicidad del MeTCS en invertebrados (DeLorenzo et al. 2008, Gaume et al. 2012) y bacterias (Farré et al. 2008). En estadios larvales de *D. rerio* se observaron malformaciones en el sistema cardiovascular, curvatura espinal, rutas alteradas del metabolismo energético y de la síntesis de ácidos grasos (Macedo et al. 2017, Fu et al. 2019). Sin embargo, todavía existe una falta de conocimiento sobre los efectos de MeTCS en el equilibrio redox y la neurotoxicidad en peces adultos luego de la exposición a TCS en matrices ambientales diferentes al agua.

Por lo dicho, el objetivo del presente capítulo fue evaluar el impacto de la exposición al sedimento enriquecido con TCS sobre las respuestas de diferentes biomarcadores en branquias, cerebro e hígado de *D. rerio* luego de 2 y 21 días de exposición.

7.2 Materiales y métodos

Para responder al objetivo propuesto, se desarrolló un bioensayo de exposición estático de 2 y 21 días de exposición, con recirculación de agua y aireación constante. El sedimento fue extraído del ambiente y procesado en condiciones de laboratorio.

7.2.1 Obtención y preparación del sedimento

Se utilizó sedimento superficial del arroyo “Las Flores” (59° 07'O y 34° 29'S), una zona de escasa intervención antrópica y previamente caracterizado por Ronco et al. (2008). Una vez extraído, el sedimento colectado se llevó al laboratorio, se procesó manualmente, eliminando la hojarasca y macrofauna, luego se homogeneizó y se lo dejó secar a temperatura ambiente (Figura 28). Posteriormente, el sedimento seco fue molido y pasado por un tamiz de 1000 µm de apertura de malla. La composición del sedimento fue caracterizada previamente por Scarcia et al. (2014) con la siguiente distribución granulométrica: arena 61%, arcilla 12% y limo 27%.

Posteriormente, el sedimento seco fue fortificado con TCS disuelto en un solvente volátil (acetona). De esta forma, se agregaron 2 ml de una solución madre de TCS a un inóculo inicial. Luego el sedimento se colocó en un mortero de vidrio, se mezcló, homogeneizó y trasvasó a un vaso de precipitado. El contenido se fue trasvasando a un botellón de vidrio color caramelo hasta completar el total del sedimento a utilizar (1 kg) dejando volumen del botellón libre para un mejor mezclado. Finalmente, el sedimento fortificado permaneció mezclándose en forma continua por 4 días según lo descrito por Pusceddu et al. (2018).

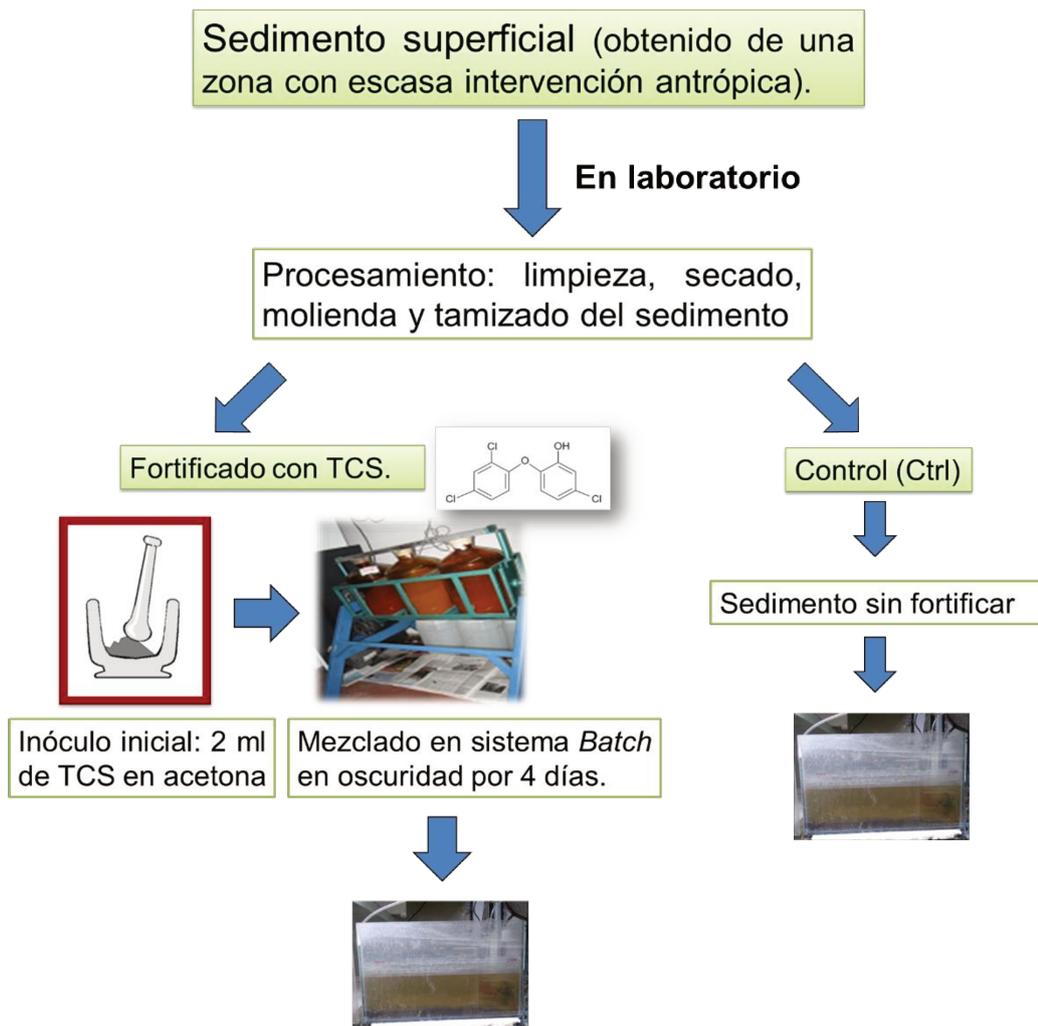


Figura 28. Esquema que resume el procesamiento del sedimento en el laboratorio luego de su extracción del ambiente.

7.2.2 Diseño experimental y determinación de parámetros biomarcadores

El diseño consideró dos condiciones experimentales: sedimento sin fortificar (control) y sedimento fortificado con TCS. Se colocó en cada pecera una capa de sedimento y agua de red no clorada en una relación 1:8 para mantener una densidad de carga de peces 1 gr peso corporal L⁻¹ y se dejó estabilizar el sistema durante 24 h. El ensayo fue de tipo estático con un circuito de agua cerrado, con aireación constante. El tiempo de exposición fue de 2 y 21 días. Luego de finalizado cada tiempo de exposición, los peces fueron anestesiados, pesados, medidos y sacrificados, para la obtención de branquias, hígado y cerebro, que se conservaron en freezer -80°C hasta el momento de su procesamiento. En los diferentes tejidos se evaluaron: capacidad de biotransformación

a partir de la actividad enzimática de GST, niveles de TBARS, ACAP y actividades enzimáticas de CAT y SOD.

Debido a la naturaleza estática del ensayo, la presencia de compuestos derivados de la actividad metabólica de los peces o del sedimento con altos niveles de materia orgánica podrían condicionar los efectos de la exposición al xenobiótico en los organismos, o incluso ser más perjudiciales que el TCS. En este sentido, se determinaron los niveles de amonio presentes en agua. Para ello se recolectaron muestras de agua a tres tiempos del ensayo (inicio, medio y final) y se filtraron con filtros de fibra de vidrio Munkell® MF/C de 0,45 µm de poro para obtener la fracción de material particulado en suspensión (MPS).

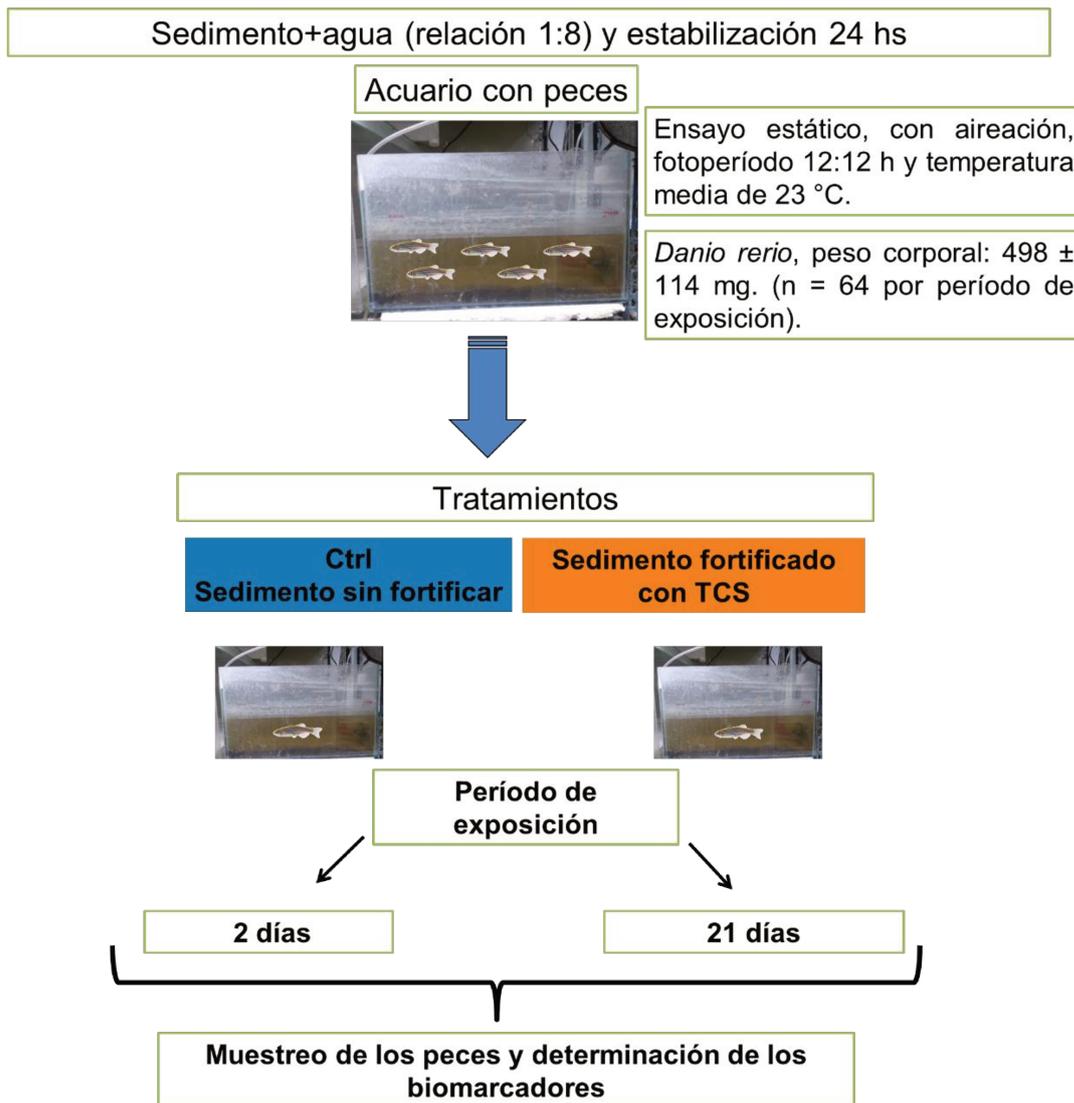


Figura 29. Esquema que resume el diseño experimental con organismos de *D. rerio* expuestos durante 2 y 21 días a un sedimento enriquecido con TCS y sus respectivos controles.

El contenido de amonio en agua se determinó según el método del fenol, el cual se basa en la formación de un compuesto azulado (indofenol) a partir de la reacción del amonio con hipoclorito y fenol en medio alcalino, catalizada por una sal manganosa. Las determinaciones se efectuaron a una longitud de onda de 635 nm y los valores se expresaron en $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{L}^{-1}$ (APHA 2005).

7.2.3 Mediciones analíticas del TCS en agua, material en suspensión y sedimento

Para las determinaciones de las concentraciones de TCS y MeTCS en agua, sedimento y material particulado en suspensión, se tomaron muestras por triplicado luego de 0, 2,

14 y 21 días. Además, al inicio del ensayo se colectaron muestras de sedimento seco fortificado para determinar las concentraciones iniciales de TCS y MeTCS en sedimento. Para el análisis MeTCS y TCS en agua, las muestras se extrajeron a través de un cartucho Waters® Oasis C18 HLB de 60 mg (Canosa et al. 2005; Elorriaga et al. 2013). Los cartuchos SPE se acondicionaron primero con 5 ml de metanol, seguido de 5 ml de agua nano-pura. Las muestras de agua se extrajeron a un caudal de 5 ml min⁻¹ bajo vacío moderado en un colector de vacío Visiprep™ SPE (Supelco, Bellefonte, PA). Después de la extracción, los cartuchos se lavaron con 5 ml de agua ultrapura y luego se secaron al aire durante 20 min al vacío. Los analitos retenidos se eluyeron con 5 ml de metanol. Los eluidos se secaron bajo una suave corriente de nitrógeno, se reconstituyeron en acetonitrilo, se pasaron a través de filtros de 0,45 µm y se transfirieron a viales cromatográficos de color caramelo.

La materia particulada en suspensión se extrajo colocando los filtros en tubos de polipropileno de 15 ml y agregando 5 ml de acetonitrilo. Se realizaron dos ciclos de sonicación de 10 min y luego se centrifugaron durante 10 min a 3000 g. Por último, se filtró 1 ml del extracto a través de membranas de 0,45 µm y luego se colocó en viales de color caramelo.

Los sedimentos se extrajeron utilizando un procedimiento *QuEChERS* modificado (Mac Loughlin et al. 2017). Se pesaron 7 g de sedimento húmedo en un tubo de polipropileno de 50 ml y se extrajeron con 15 ml de acetonitrilo. Después de añadir el disolvente, los tubos se agitaron vigorosamente y luego se sonicaron durante 10 min, se agitaron durante 1 min y se sonicaron de nuevo. Se añadieron sales de extracción (2 g de NaCl y 6 g de MgSO₄ anhidro) y se agitaron manualmente durante 2 min. Finalmente, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 3000 g. Se filtraron alícuotas de 1 ml del

sobrenadante (acetonitrilo) a través de filtros de 0,45 μm , y se colocaron en dos viales cromatográficos de color caramelo. Uno se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis MeTCS por GC- μECD , mientras que el otro se analizó inmediatamente para TCS por HPLC-MS. El TCS se identificó y cuantificó mediante HPLC-MS mediante el uso de un cromatógrafo de líquidos (Agilent modelo 1100) acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple Agilent modelo VL (Agilent Technologies Inc., Miami, FL, EE. UU.). Para la ionización, se utilizó una fuente de electropulverización en modo negativo con iones selectivos m/z 287,7 y 288,7. El cromatógrafo se equipó con una columna C_{18} XSELECT™ (75 mm x 4,6 mm y tamaño de poro de 3 μm , de Waters Corp., Milford), la separación se realizó en condiciones isocráticas de metanol (grado HPLC, JT Baker, EE. UU.) y agua nano-pura (ácido fórmico 0,1%, calidad analítica, Merck, Alemania), con un caudal de $0,5\text{ ml min}^{-1}$. Los límites instrumentales de detección fueron de $0,1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ y el límite de cuantificación fue de $0,5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

El MeTCS se identificó y cuantificó con GC- μECD mediante el uso de un cromatógrafo de gases Agilent 6890N. El sistema estaba equipado con una columna HP-5 (15 m x 0,53 mm de di x 1,5 μm de espesor de película). Se inyectó un volumen de 3 μL en modo *splitless*, con la temperatura del inyector a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. La rampa de temperatura se estableció fijando una temperatura inicial de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, aumentada a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, y luego a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, con un programa de adquisición total de 15 min. Se utilizó hidrógeno como gas portador y nitrógeno como gas auxiliar. El detector se fijó a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los límites instrumentales de detección y cuantificación fueron de 0,5 y $1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

7.2.4 Análisis estadístico

Se comprobó la normalidad de los datos y homogeneidad de varianza con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias significativas entre cada grupo Ctrl y los tratamientos se evaluaron con la prueba *t-student* con valor $p < 0,05$. Además, se realizó un ACP (ver sección 5.2.5, capítulo II) para obtener una vista general de las respuestas biológicas en los distintos órganos y para definir los parámetros más importantes involucrados en la toxicidad TCS-MeTCS en ambos tiempos de exposición. Se excluyeron valores atípicos y se consideraron siete casos por tratamiento y doce variables. El análisis fue realizado con el software InfoStat (Di Rienzo et al. 2020).

7.3 Resultados

En relación al objetivo de evaluar los efectos promovidos por una fuente de TCS en sedimento sobre *D. rerio*, se presentan los resultados obtenidos.

7.3.1 Parámetros de calidad del agua en acuarios y concentración efectiva de TCS y MeTCS

Los parámetros fisicoquímicos del agua se detallan en la Tabla 12. El oxígeno disuelto, el pH y la conductividad permanecieron sin cambios durante los períodos experimentales. Sin embargo, las concentraciones de amonio entre las peceras Ctrl y fortificadas con TCS se diferenciaron en ambos tiempos de exposición.

En el tratamiento sin fortificar, los niveles de detección del TCS y MeTCS estuvieron por debajo del nivel de detección en sedimento, agua y material particulado en suspensión.

Las concentraciones efectivas de TCS y MeTCS en el tratamiento fortificado se presentan en la Tabla 13. Ambos compuestos estaban presentes en el sedimento, sin embargo, solo se detectó MeTCS en el agua. Aproximadamente el 1% del MeTCS detectado en el sedimento se movilizó hacia la columna de agua. No se observaron diferencias en la concentración de MeTCS en el agua durante los tiempos de exposición, con un valor de exposición promedio de $12,3 \pm 1,1 \mu\text{g L}^{-1}$. No se detectaron TCS ni MeTCS (sedimento y agua) en el Ctrl. La humedad del sedimento fue de $43 \pm 2,4\%$ y la materia orgánica total fue de $3,1 \pm 0,4\%$.

Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos del agua medidos en acuarios en condiciones de control (Ctrl) o expuestos a sedimento enriquecidos con TCS (fortificado).

	2 días		21 días	
	Ctrl	Fortificado	Ctrl	Fortificado
Oxígeno disuelto (mg O₂ L⁻¹)	8,1 ± 0,1	7,9 ± 0,6	7,6 ± 0,3	7,2 ± 0,5
pH	8,4 ± 0,1	8,5 ± 0,1	8,5 ± 0,1	8,3 ± 0,4
Conductividad (µS cm⁻¹)	959,0 ± 49,0	935,0 ± 51,0	874,1 ± 81,0	910,0 ± 110,0
Amonio (µg N-NH₄⁺ L⁻¹)	700,0 ± 60,0	300,0 ± 200,1	400,0 ± 10,2	110,0 ± 100,1

Los valores se expresan como media ± desvío estándar.

Tabla 13. Concentraciones efectivas de TCS y MeTCS en sedimento, agua y material particulado en suspensión en diferentes tiempos de exposición para tratamiento fortificado.

	Inicio del ensayo		2 días		21 días	
	TCS	MeTCS	TCS	MeTCS	TCS	MeTCS
Sedimento (µg kg⁻¹ peso seco)	226 ± 8	2832 ± 216	220 ± 6	2488 ± 602	65 ± 9	2173 ± 658
Agua (µg L⁻¹)	<LD	11,4 ± 2,0	<LD	11,9 ± 2,5	<LD	13,6 ± 3,4
MPS	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Los valores se presentan como media ± desviación estándar. <LD: por debajo de los límites de detección. MPS: material particulado en suspensión.

7.3.2. Parámetros morfométricos

No se registraron cambios significativos en la FC e IHS de *D. rerio* luego de ambos periodos de exposición al sedimento enriquecidos con TCS (Tabla 14).

Tabla 14. Factor de condición (FC) e índice hepatosomático (IHS) de *D. rerio*.

	2 días		21 días	
	Ctrl	TCS-MeTCS	Ctrl	TCS-MeTCS
FC	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2
IHS	2,2 ± 0,9	1,9 ± 0,8	1,7 ± 0,7	2,1 ± 0,9

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

7.3.3 Biomarcadores de estrés oxidativo, biotransformación y neurotoxicidad

Luego de 2 días de exposición, la actividad de SOD aumentó un 36% y ACAP disminuyó un 48% con respecto a Ctrl en hígado de *D. rerio* (Figura 30). Por otro lado, después de los 21 días de exposición con sedimento enriquecido con TCS, todos los biomarcadores hepáticos evaluados presentaron cambios significativos con respecto al Ctrl: la actividad de SOD y CAT aumentó (58% y 35% respectivamente), la actividad GST se inhibió (12%), ACAP disminuyó en un 40% y el daño por lípidos aumentó en un 57%.

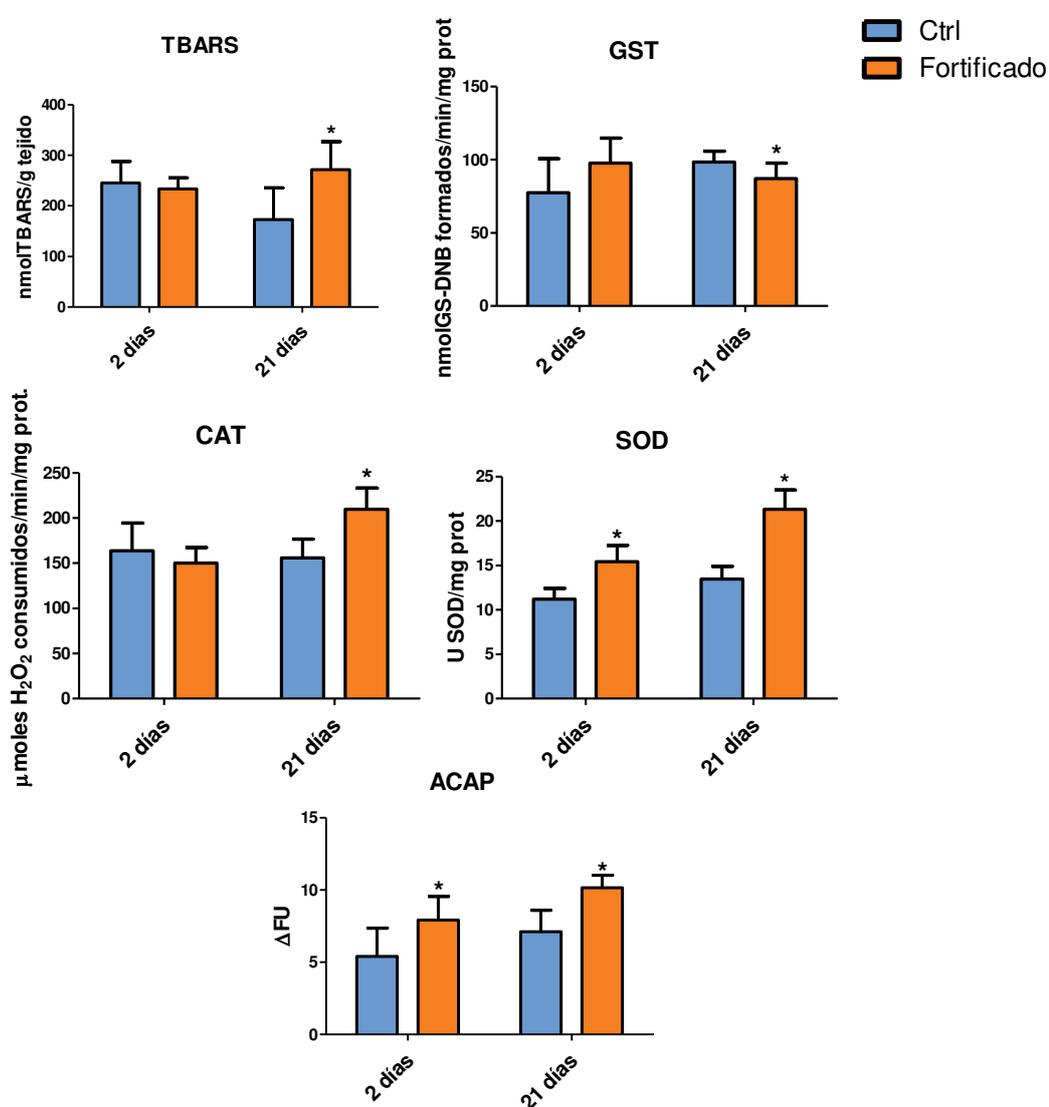


Figura 30. Marcadores bioquímicos en hígado de *D. rerio* después de 2 y 21 días de exposición a sedimento enriquecido con TCS. * representan diferencias significativas con el grupo control ($p < 0.05$). Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar. Δ FU: diferencia de fluorescencia, donde la menor altura de las barras representa una mayor capacidad antioxidante y viceversa.

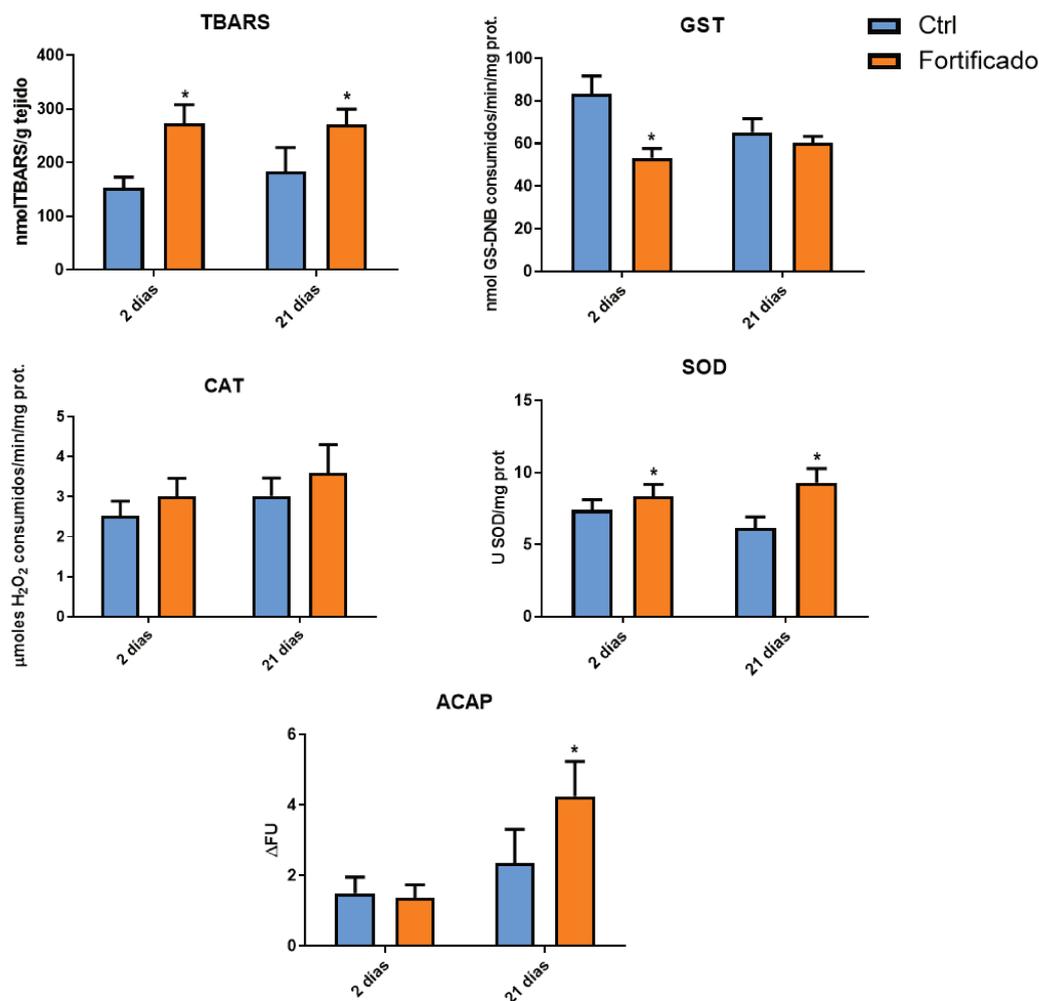
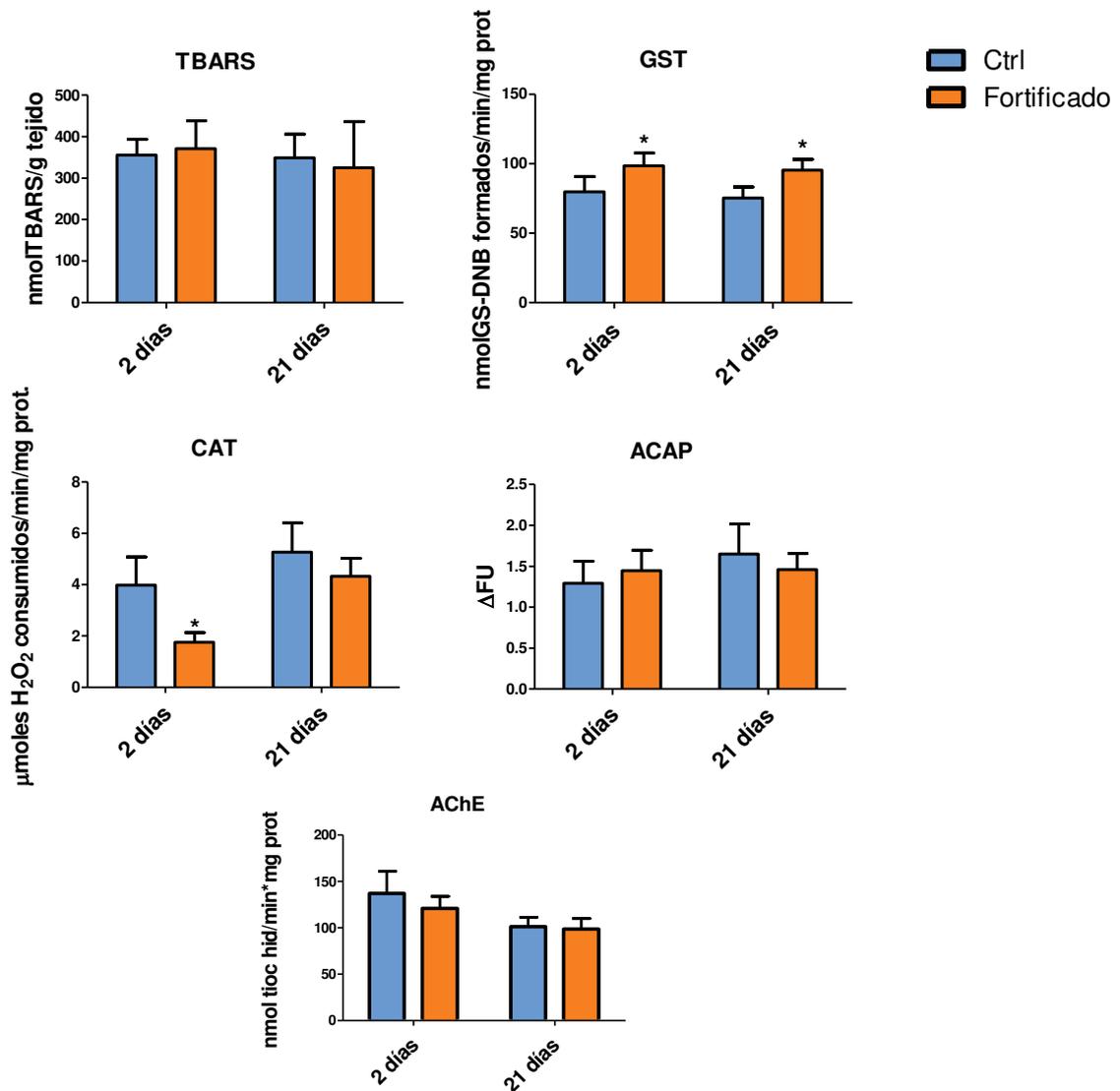


Figura 31. Biomarcadores en branquias de *D. rerio* luego de 2 y 21 días de exposición a sedimento enriquecido con TCS. * representan diferencias significativas con el grupo control ($p < 0.05$). Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar. Δ FU: diferencia de fluorescencia, donde la menor altura de las barras representa una mayor capacidad antioxidante y viceversa.

En la Figura 31. se muestran los biomarcadores evaluados en branquias de *D. rerio* luego de 2 y 21 días de exposición a sedimento enriquecido con TCS. Luego de 2 días, los niveles de TBARS aumentaron un 75% respecto al Ctrl, este cambio fue acompañado por un incremento significativo en la actividad de la SOD (12%) y por una disminución en la actividad de la GST (36%), mientras que no se registraron diferencias en ACAP como tampoco en la actividad de la CAT. En la exposición prolongada a TCS, el daño en lípidos y la actividad de la SOD aumentaron significativamente (48% y 50% respectivamente).

Por su parte los niveles de ACAP disminuyeron (68%) y no se observaron cambios en la actividad de CAT y la GST respecto a branquias de los peces control.

Figura 32. Biomarcadores en cerebro de *D. rerio* luego de 2 y 21 días de exposición a sedimento enriquecido con TCS. * representan diferencias significativas con el grupo control ($p < 0.05$). Los resultados



se expresan como media ± desvío estándar. ΔFU: diferencia de fluorescencia, donde la menor altura de las barras representa una mayor capacidad antioxidante y viceversa.

Los efectos producidos en el cerebro de adultos de *D. rerio* expuestos a sedimento enriquecido con TCS se presentan en la Figura 32. La actividad de CAT disminuyó un 56% en peces luego de 2 días y GST aumentó luego de 2 y 21 días de exposición (23 y 26%

respectivamente). La actividad de AChE no mostró diferencias entre los organismos tratados y Ctrl en ninguno de los tiempos de exposición.

7.3.4 Integración de marcadores bioquímicos: Análisis de componentes principales

En la Figura 33 se muestra el ACP considerando los tratamientos y tiempos de exposición. El CP1 y CP2 explicaron el 48% de la varianza total de los datos. Un total de cuatro autovalores fueron superiores a 1, además los coeficientes de correlación con las variables originales $>0,58$ fueron los que explicaron mayormente la varianza observada. El primer componente (CP1) explicó el 30% de la variación de los datos y permitió diferenciar los grupos Ctrl de los peces expuestos. Por otro lado, los peces que estuvieron en exposición a corto plazo fueron agrupados y diferenciados de los peces expuestos durante 21 días por el CP2 (18%). ACAP y CAT en hígado, así como por TBARS, GST y CAT en branquias, explicaron la variabilidad observada en el CP1 y CAT en cerebro en el CP2. Por su parte la actividad CAT en cerebro e hígado y la actividad de la GST en branquias permitieron explicar las diferencias entre los organismos que estuvieron expuestos durante 21 días de los peces expuestos durante 2 días.

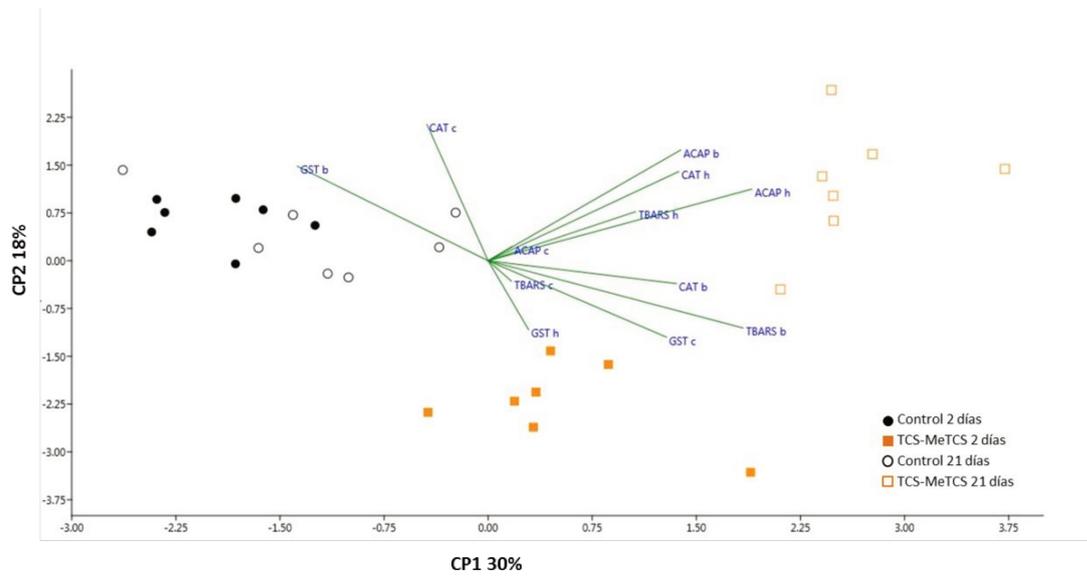


Figura 33. ACP que muestra el agrupamiento de los datos de los marcadores bioquímicos en hígado (h), branquias (b) y cerebro (c) e individuos (los símbolos indican diferentes tratamientos; n=7). Todas las abreviaturas de los marcadores se explican en el texto. Los símbolos rellenos representan la exposición de 2 días a sedimentos enriquecidos con TCS y los símbolos en blanco a la exposición de 21 días.

7.4 Discusión

Los parámetros físicos del sedimento utilizado en el presente trabajo de Tesis, tales como la materia orgánica total y porcentaje de humedad fueron consistentes con lo registrado por Giusto et al. (2012, 2014) para el sedimento en el arroyo "Las Flores" (Buenos Aires, Argentina). El proceso de fortificado de sedimentos con TCS implicó una interacción inicial del tóxico con el sedimento para favorecer los procesos de adsorción y estabilización. En la presente Tesis, los resultados indicaron que luego de 6 días de la adición del TCS a sedimentos no estériles, más del 90% de TCS se había degradado y biotransformado a MeTCS. En coincidencia con nuestros resultados, Chen et al. (2011) informaron que el 75% de TCS se eliminó en sedimentos dentro de los 6 días en condiciones aeróbicas. Además, Ho et al. (2013) mostraron que el TCS en el sedimento se redujo del 46 al 60% de la concentración nominal después de 3 días. La capacidad de degradación del TCS y transformación a MeTCS dependen principalmente de la capacidad de sorción y estado redox del sedimento, así como de la concentración inicial de TCS (Huang et al. 2015). En este contexto, las bacterias presentes en el sedimento metabolizarían el TCS hacia MeTCS manteniéndose constante la concentración de MeTCS durante 21 días. El sedimento actuó como una fuente de contaminante, liberando continuamente MeTCS al agua y manteniendo estable su concentración durante todo el período de exposición. Asimismo, los niveles detectados de TCS en sedimento ensayados en este trabajo fueron ambientalmente relevantes (Davis et al. 2012, Pusceddu et al. 2018).

Aunque se ha informado TCS en el material particulado (Kumar et al. 2010), su falta de detección en dicha matriz en este estudio podría deberse a la baja resuspensión del sedimento provocada por *D. rerio*. La presencia de especies bentónicas podría generar

un mayor movimiento de partículas en el agua y, por tanto, mayores cantidades de contaminantes para los peces.

Si bien el amonio mostró variabilidad, incluso en el grupo control, estos valores fueron inferiores a la cantidad máxima permitida para la protección de la vida en agua dulce ($1130 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$) de acuerdo con los criterios de vida acuática recomendados por USEPA, 1999. La posible estabilización del sistema experimental podría explicar la variabilidad de los valores de amonio observados en nuestro trabajo (Stief et al. 2003). Además, el pH y la conductividad fueron similares a los valores recomendados para la cría y mantenimiento de *D. rerio* (Avdesh et al. 2012).

Una de las principales funciones del hígado es metabolizar sustancias lipofílicas, incluidos los xenobióticos (Di Giulio y Hinton, 2008), por lo que es un órgano de interés para evaluar los efectos tóxicos generados por contaminantes. El aumento de la actividad de SOD observado en dicho órgano después de la exposición a corto plazo a sedimentos enriquecidos con TCS, mostró que las defensas antioxidantes se activaron para contrarrestar el anión superóxido y pudieron prevenir el daño oxidativo en lípidos. El mayor daño hepático se observó luego de 21 días, donde la activación de ambas enzimas antioxidantes, SOD y CAT, no fueron suficientes para prevenir el daño lipídico. Debido a que la CAT degrada el H_2O_2 en agua y el oxígeno, el aumento en el contenido de H_2O_2 generado por la actividad de la SOD podría explicar el aumento de la actividad de la CAT observado en nuestro estudio. Se observaron resultados similares en el hígado de peces como *Oreochromis niloticus* y *Clarias gariepinus* luego de la exposición a contaminantes orgánicos como butaclor (herbicida) y azinfos-metil (insecticida) (Oruc et al. 2004, Farombi et al. 2008). Además, la capacidad total contra los radicales peroxilos luego de los 21 días continuó disminuyendo, lo que evidencia una disminución

generalizada de la capacidad antioxidante hepática después de una exposición prolongada a sedimentos enriquecidos con TCS. Respecto a la actividad de GST, el nivel más bajo de esta enzima en el hígado de los peces sugiere una reducción significativa de su capacidad para resistir el estrés oxidativo después de 21 días de exposición. En este sentido, la expresión de ARNm de *gst* disminuyó con el tiempo después de la exposición a TCS en el hígado del bagre *P. fulvidraco* (Ku et al. 2014). Dicha inhibición podría deberse a una degradación incompleta del TCS absorbido por los peces (Ku et al. 2014). En este contexto, debido a la similitud estructural del TCS con los policlorobifenoles, el bisfenol A y las dioxinas, se cree que el TCS podría actuar como inhibidor selectivo, además de sustrato, de las enzimas de fase II (Wang et al. 2004).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Paul et al. (2020), quienes encontraron en *P. hypophthalmus* aumentos significativos de las actividades de SOD, CAT y GST en el hígado, después de 30 días de exposición a 91 y 182 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS en agua. Asimismo, Li et al. (2018) observaron un aumento de la actividad CAT hepática y daño oxidativo en lípidos en *Carassius auratus* luego de 15 días de exposición a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Hemalatha et al. (2019) informaron el mismo efecto en el hígado de *Labeo rohita* después de una exposición prolongada a TCS.

Las branquias son el principal sitio de absorción de la mayoría de los tóxicos transmitidos por el agua y el principal sitio de impacto tóxico para muchos de ellos (Ale et al. 2018). La toxicidad a corto plazo en las branquias se atribuye a que el TCS ingresa al cuerpo del pez principalmente a través de la difusión pasiva por la membrana branquial, lo que resulta en una mayor toxicidad en este órgano (Khatikarn et al. 2018). Los resultados mostraron que las branquias fueron el único órgano que mostró un aumento en los niveles de peroxidación lipídica en *D. rerio* después de ambos tiempos de exposición a

sedimentos enriquecidos con TCS. La enzima GST participa en la defensa contra el estrés oxidativo catalizando la degradación de compuestos dañinos endógenos como los hidroxicualquenos, productos de degradación de la peroxidación lipídica (Cnubee et al. 2001). En este sentido, el aumento del daño lipídico podría haber generado una gran cantidad de metabolitos de la peroxidación lipídica produciendo la inhibición de GST observada tras la exposición a corto plazo (Farombi et al. 2008). Se informaron respuestas de GST similares después de 48 horas de exposición de *Channa punctatus* a deltametrina (Sayeed et al. 2003).

La mayor actividad de SOD, observada en las branquias después de ambos períodos de exposición, sugiere un aumento en el anión superóxido y una respuesta para contrarrestarlos por parte de las células. Sin embargo, no fue suficiente para prevenir el daño de los lípidos en este tejido en ninguno de los dos períodos de exposición probados. Paul et al. (2020) reportaron respuestas similares en la actividad de SOD para branquias de *P. hypophthalmus* después de diferentes concentraciones de TCS y valores de pH.

Asimismo, la disminución de la capacidad antioxidante total frente a radicales peroxilos luego de 21 días, permitiría afirmar que luego de una exposición prolongada se disminuyó la respuesta antioxidante en las branquias de *D. rerio*. Por tanto, el sedimento enriquecido con TCS produjo una disminución de la capacidad de las células branquiales para contrarrestar los radicales peroxilo. De acuerdo con los resultados, Wang et al. (2017) registraron en *Carassius auratus* una disminución en la capacidad contra radicales después de 14 días de exposición a TCS. Además, Wang et al. (2019) encontraron una disminución de las defensas antioxidantes en *D. rerio* después de 42 días de exposición a TCS.

El cerebro fue el órgano menos sensible de *D. rerio* expuesto a sedimentos enriquecidos con TCS. La actividad de GST aumentó en ambos períodos de exposición. Araújo et al. (2019) reportaron la misma respuesta en larvas de *D. rerio* después de 22 días de exposición a TCS. Este mecanismo podría explicar la ausencia de daño lipídico en dicho órgano. De acuerdo con nuestros resultados, Paul et al. (2020) hallaron una mayor actividad de GST en el cerebro de *P. hypophthalmus* después de 30 días de exposición a TCS, mientras que Gyimah et al. (2020) encontraron inhibición de la actividad CAT en el cerebro de *D. rerio* luego de la exposición a TCS. Además, Gyimah et al. (2020) demostraron ausencia de daño a los lípidos cerebrales después de una exposición prolongada a TCS. En general, se registraron resultados contradictorios en el cerebro de los peces, por lo que se deben realizar más estudios que consideren biomarcadores neurológicos.

Los cambios potenciales que ocurren en el cerebro podrían provocar una alteración en el comportamiento de los peces, incluida su capacidad para escapar de los depredadores, reproducirse y competir con otros peces (Araújo et al. 2016). En este sentido, la AChE es un biomarcador útil de los efectos neurotóxicos de las sustancias químicas en los organismos. En el presente estudio no se han observado diferencias entre los tratamientos, sin embargo, numerosos trabajos informaron inhibiciones de AChE después de la exposición a TCS (Sahu et al. 2018, Paul et al. 2019, 2020, Li et al. 2018), aunque cabe aclarar que aquellos utilizaron mayores concentraciones que las del presente estudio.

Según el análisis de componentes principales, el CP1 separó claramente a los peces expuestos a sedimentos con TCS del Ctrl, independientemente del tiempo de exposición, mientras que el efecto del tiempo de exposición se explicó (CP2) por las actividades de

las enzimas antioxidantes. Después de ambos tiempos de exposición, los órganos más afectados fueron el hígado y las branquias; sin embargo, los biomarcadores que explicaron la variabilidad fueron respectivamente diferentes. Después de 2 días de exposición, las actividades enzimáticas CAT y GST fueron los biomarcadores más importantes, lo que significa que después de la exposición a corto plazo, *D. rerio* pudo responder y contrarrestar el daño oxidativo en el hígado y el cerebro.

Por otro lado, luego de 21 días de exposición, los principales cambios se observaron en ACAP y TBARS, por lo que después de un período prolongado los organismos perdieron la capacidad de contrarrestar las ROS y provocó daños en los lípidos.

La realización de estudios prolongados que reflejen un escenario ambiental como la exposición a sedimentos con TCS puede considerarse una herramienta útil en la evaluación de riesgos ambientales. De acuerdo con nuestros resultados, Pusceddu et al. (2018) observaron una inhibición del desarrollo de larvas de embrión en *Perna perna* después de la exposición a concentraciones ambientales ($7,5-750 \mu\text{g kg}^{-1}$) de TCS en sedimento.

Por otro lado, las investigaciones sobre la toxicidad de los sedimentos contaminados se han visto limitadas por la complejidad de la columna de agua y sedimento. Sin embargo, esta clase de bioensayos son necesarios para evaluar la toxicidad de un contaminante presente en sedimento porque representan el escenario de exposición más realista para considerar la biodisponibilidad (Hallare et al. 2011). Además, es importante emplear organismos test que no estén en contacto directo con el sedimento pero que puedan igualmente verse afectados por los contaminantes liberados. En dicho contexto, los diferentes biomarcadores evaluados en la presente Tesis, y considerando que el 1% de MeTCS estuvo disponible en la columna de agua, los resultados demostraron que la

interacción de los peces con el sistema conteniendo el sedimento fortificado con TCS promovió efectos adversos sobre los parámetros bioquímicos en *D. rerio*.

**Capítulo V: Enfoque multibiomarcador
de los efectos tóxicos promovidos por el
triclosán sobre las respuestas
bioquímicas en organismos adultos de *D.*
*rerio***

8.1 Introducción

Los ecosistemas acuáticos, al ser receptores finales de los contaminantes, sufren altos niveles de perturbación. Para enfrentar el problema de la contaminación, las políticas internacionales se han basado en evaluaciones de la salud de los ecosistemas, esencialmente en las concentraciones químicas y en la estructura y composición de las comunidades biológicas. Sin embargo, en las últimas dos décadas, surgió la necesidad de incorporar un enfoque centrado en las respuestas de biomarcadores a nivel de sub individuos con el objetivo de complementar las herramientas de evaluación ambientales (Devin et al. 2014). Los enfoques multibiomarcadores han sido ampliamente utilizados con el fin de 1) evaluar los efectos ecotoxicológicos de contaminantes tales como plaguicidas y productos farmacéuticos (Barreto et al. 2018; Dey et al. 2016) y 2) comprender las relaciones entre los biomarcadores y los niveles de contaminación (Baudou et al. 2019; Iturburu et al. 2018). En este sentido, numerosas investigaciones han desarrollado herramientas capaces de integrar y resumir la Respuesta de un conjunto de biomarcadores en un solo valor y/o gráfico (Beliaeff y Burgeot 2002; Chèvre et al. 2003; Hagger et al. 2008; Sánchez et al. 2012).

La utilización de un conjunto de respuestas de alerta temprana, como los biomarcadores bioquímicos utilizados en la presente Tesis, permite obtener índices globales de daño promovidos por TCS en los peces. En este contexto, la respuesta integrada de biomarcadores, IBR por sus siglas en inglés (*integrated biomarker response*) constituye una herramienta práctica y sólida para evaluar la sensibilidad de *D. rerio* frente al TCS. El IBR es un método que proporciona tanto una síntesis gráfica de las diferentes respuestas de los biomarcadores, así como un valor numérico que integra todas estas respuestas a la vez (Devin et al. 2014). El método gráfico combinado con el cálculo del

área integrada por los biomarcadores ha sido aplicado inicialmente por Beliaeff y Burgeot (2002) a estudios de campo. En la actualidad, la estimación del IBR se usa tanto para estudios de campo como en laboratorio y algunas investigaciones ya han utilizado el IBR para evaluar el efecto del TCS en peces. Por ejemplo, Paul et al. (2020) utilizaron el análisis de IBR para evaluar el efecto del TCS luego de 30 días de exposición en organismos de *P. hypophthalmus*. Asimismo, Li et al. (2018) emplearon el índice para evaluar el efecto global del TCS en *C. auratus* luego de 3 y 15 días de exposición. Por lo dicho, el objetivo del presente capítulo fue obtener un enfoque multibiomarcador de los efectos tóxicos promovidos por el TCS en organismos adultos de *D. rerio* mediante la implementación de dos herramientas que permiten estimar las respuestas integradas de biomarcadores (IBR).

8.2 Materiales y métodos

Con el fin de observar respuestas integradoras a nivel de los individuos en su totalidad, se consideraron las respuestas de biomarcadores bioquímicos promovidos en hígado, cerebro y branquias de los peces adultos expuestos a TCS en las matrices evaluadas. Para dicho análisis, se utilizaron los dos métodos mayormente utilizados para estimar los valores de IBR: el método descrito por Devin et al. (2014) y el descrito por Sánchez et al. (2012). Para los análisis en hígado y branquias de los peces, los marcadores bioquímicos considerados fueron: TBARS, GST, CAT, ACAP y SOD, mientras que en cerebro fueron TBARS, GST, CAT, ACAP y AChE (a excepción del bioensayo de 2 días, donde no se estimó la actividad de AChE). En tanto, para el bioensayo de exposición *ex vivo* los marcadores bioquímicos considerados fueron TBARS, GST, CAT y GSH.

8.2.1 Respuestas integradas (IBR) según método de Devin et al. (2014)

El valor del IBR se obtiene de la suma del área definida por los n biomarcadores dispuestos en disposición radial (siguiendo un paso previo de estandarización de las respuestas de los biomarcadores) que permite integrar todas las respuestas biológicas. En este sentido, un mayor valor del IBR indica mayor nivel de estrés en los organismos (Devin et al. 2014).

Inicialmente, el resultado final del proceso de cálculo dependía en gran medida de la organización secuencial de los biomarcadores (Beliaeff y Burgeot 2002), es decir, el orden en que se consideraban era relevante para estimar el valor de IBR. La ecuación de Devin et al. (2014) para calcular el valor de IBR se basa en tres pasos principales descritos por Beliaeff y Burgeot (2002), y un cuarto paso que presenta ligeras modificaciones al

cálculo original, lo que permite considerar todas las combinaciones de ordenamiento posibles de los biomarcadores.

En este contexto, esta metodología de cálculo del índice fue elegida ya que realiza una elección arbitraria de la disposición de los biomarcadores que la fórmula original de Beliaeff y Burgeot (2002) no permitía, conllevando a eventuales errores de interpretación de los resultados.

A continuación, se describe la fórmula utilizada:

El valor medio para un tratamiento (**X**) se estandarizó usando el valor medio para cada biomarcador (**m**) y la desviación estándar para (**s**) producir un valor Y: $Y = (X - m)/s$. Para cada biomarcador, se calcula el valor $Z = Y$ o $Z = -Y$ según el efecto biológico de activación/aumento o inhibición/disminución, respectivamente. El valor de S se calculó con $S = Z + |\text{Min}|$, donde Min es el valor mínimo observado para cada biomarcador de cada tratamiento. Cada punto del gráfico de estrella es un valor de S_i . Devin et al. (2014) incorporaron un cálculo trigonométrico en el cual el área del triángulo definido por dos biomarcadores sucesivos en un estudio de n biomarcadores (donde se consideran al menos cuatro biomarcadores). Para evitar las fuertes dependencias en la disposición de cada biomarcador se utilizó un procedimiento de permutación que conduce a $(n-1)!/2$ valores posibles, donde n es el número de biomarcadores, lo que permite considerar todos los valores IBR correspondientes a cada disposición posible utilizando la mediana de todos los valores del índice como valor del índice final. Entonces el valor de IBR queda determinado por la siguiente fórmula:

$$\text{IBR} = \sum_{i=1}^n A_i \quad \text{con} \quad A_i = S_i * S_{i+1} * \text{sen} (2\pi/n) / 2$$

Donde el IBR es el área total de la suma de A_i y A_i se define como el área de cada triángulo que se forman entre dos biomarcadores sucesivos con n biomarcadores.

La metodología propuesta por Devin et al. (2014) posibilita, además, evaluar diferencias significativas entre los valores de IBR de los distintos grupos experimentales. De esta manera se evaluaron las diferencias entre organismos expuestos a TCS y los grupos control mediante la prueba *t-student* para dos muestras pareadas con el supuesto de normalidad y homocedasticidad de los datos. Con el objetivo de incluir la variabilidad del IBR entre permutaciones, se repitieron 100 veces por defecto el muestreo aleatorio de los valores de IBR entre todos los calculados dentro de cada tratamiento, y cada vez se realizó una prueba *t-student* entre ambas categorías (tratados y no tratados con TCS). Luego el valor p de cada prueba se corrigió para múltiples comparaciones y finalmente, el valor p utilizado fue la media de los valores p corregidos.

Los cálculos de IBR y análisis estadístico de los datos fueron realizados utilizando la herramienta *CALculate* IBR mediante el *software* CALIBRI (<https://shiny.otelo.univ-lorraine.fr/calibri/R/>) desarrollado por Simon Devin y Virginie Jouffret en Laboratorio Interdisciplinario para Ambientes Continentales (LIEC) de la Universidad de Lorraine, Francia.

8.2.2 Respuestas integradas (IBRv2) según método de Sánchez et al. (2012)

El método de Sánchez et al. (2012) se escogió porque permite eliminar la dependencia a la disposición de los biomarcadores y discriminar la inducción e inhibición para cada biomarcador a través del contraste con un grupo de referencia (CtrlSv o Ctrl).

En este método, para cada biomarcador se comparan los valores medios (X_i) de los grupos expuestos respecto al valor medio (X_0) de ese biomarcador del grupo Ctrl/CtrlSv:

$Y_i = \log (X_i/X_0)$. La media general del biomarcador (μ) y la desviación estándar (σ) de los Y_i son calculados y estandarizados: $Z_i = (Y_i - \mu) / \sigma$.

Z_i : media de la respuesta estandarizada del biomarcador i tratado con TCS; Z_0 : media del biomarcador de referencia (CtrlSv). Luego, se representa la variación del biomarcador i centrándola a su línea de base $\rightarrow A = Z_i - Z_0$. Finalmente se obtiene una respuesta integrada multibiomarcadora a partir de la suma de valores absolutos de A para cada biomarcador

$$IBRv2 = \sum |A|$$

El estudio de las respuestas integradas fue evaluado en esta oportunidad a partir de los valores de IBR y de los gráficos de estrella ya que posibilitan inferir diferencias entre valores de referencia (Ctrl o CtrlSv) para cada condición ensayada.

La estimación del índice de Sanchez et al. (2012) y los gráficos de estrella se realizaron con la colaboración y asesoramiento del Lic. Patricio Torres del centro de investigación y docencia en TIC (CIDETIC) (<https://serv.cidetic.unlu.edu.ar/ibr/#info>) de la Universidad Nacional de Luján.

8.3 Resultados

8.3.1 Análisis de IBR según Devin et al. (2014)

En la Tabla 15 se muestran los valores de IBR obtenidos para cada evaluación con TCS.

En términos generales, en todos los órganos evaluados los valores de IBR se diferenciaron significativamente de los grupos control. Branquias e hígado de los peces expuestos durante 21 días a TCS en agua presentaron aumentos en los valores de IBR mientras que en cerebro se observó una disminución significativa en los valores de IBR. En el período de 2 días de exposición en agua, los valores de IBR para hígado y cerebro disminuyeron respecto a los de CtrlSv. Sin embargo, en branquias, el aumento del valor neto de IBR se evidenció para ambas concentraciones de TCS.

Tabla 15. Valores de los IBR según el cálculo propuesto por Devin et al. (2014) para cada órgano en las diferentes condiciones de exposición a TCS.

Tratamiento	Matriz	Tiempo de exposición	Hígado	Branquias	Cerebro
CtrlSv	agua	2 días	3,6 ± 0,6	0,8 ± 0,8	4,6 ± 0,1
100 µg L ⁻¹ de TCS	agua	2 días	0,4* ± 0,4	4,7* ± 0,3	0,3* ± 0,4
189 µg L ⁻¹ de TCS	agua	2 días	1,4* ± 0,7	1,6* ± 0,4	0*
CtrlSv	agua	21 días	0	0,7 ± 0,3	5,2 ± 0,1
60 µg L ⁻¹ de TCS	agua	21 días	3,7* ± 0,5	0,2 ± 0,1	0,5* ± 0,4
3 µg L ⁻¹ de TCS	agua	21 días	3,8* ± 0,4	2,5* ± 0,9	0,6* ± 0,4
Ctrl	sedimento	2 días	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,6	0,6 ± 0,7
Fortificado con TCS	sedimento	2 días	0,8 ± 0,3	2,5* ± 0,9	1,5 ± 0,4
Ctrl	sedimento	21 días	0,8 ± 0,4	1,0 ± 0,3	3,6 ± 1,2
Fortificado con TCS	sedimento	21 días	7,1* ± 0,2	7,6* ± 0,2	6,0* ± 0,3
CtrlSv	<i>ex vivo</i>	1 hora		1,6 ± 0,8	
340 µg L ⁻¹ TCS	<i>ex vivo</i>	1 hora		3,2* ± 0,1	
1000 µg L ⁻¹ TCS	<i>ex vivo</i>	1 hora		0,4* ± 0,4	

Los valores se muestran como media ± desvío estándar. * Indica diferencias significativas (p<0,05) entre los tratamientos con TCS y grupos control.

En relación a la exposición *ex-vivo* de branquias de *D. rerio*, se observó un aumento del valor de IBR en las branquias expuestas a la menor concentración de TCS y una disminución en branquias expuestas a 1000 µg L⁻¹ TCS.

8.3.2 Análisis de gráfico de estrellas e IBRv2 según Sanchez et al. (2012)

En la Tabla 16 se muestran los gráficos de estrella y valores de IBR para los bioensayos de exposición a TCS en organismos adultos de *D. rerio* en los diferentes órganos, matrices, concentraciones y tiempo de exposición. Las representaciones de estrellas indican cómo cada biomarcador individual contribuyó a explicar el IBR obtenido para cada grupo experimental referido a su grupo CtrlSv/Ctrl.

Se observó que, en las evaluaciones de toxicidad con TCS en matriz agua, hígado siempre mostró la misma tendencia a aumentar el contenido de TBARS, mientras que en branquias siempre se evidenció inhibición de CAT. En cuanto a cerebro, se observó una tendencia en la disminución en el contenido de ACAP para todas las concentraciones ensayadas de TCS en agua.

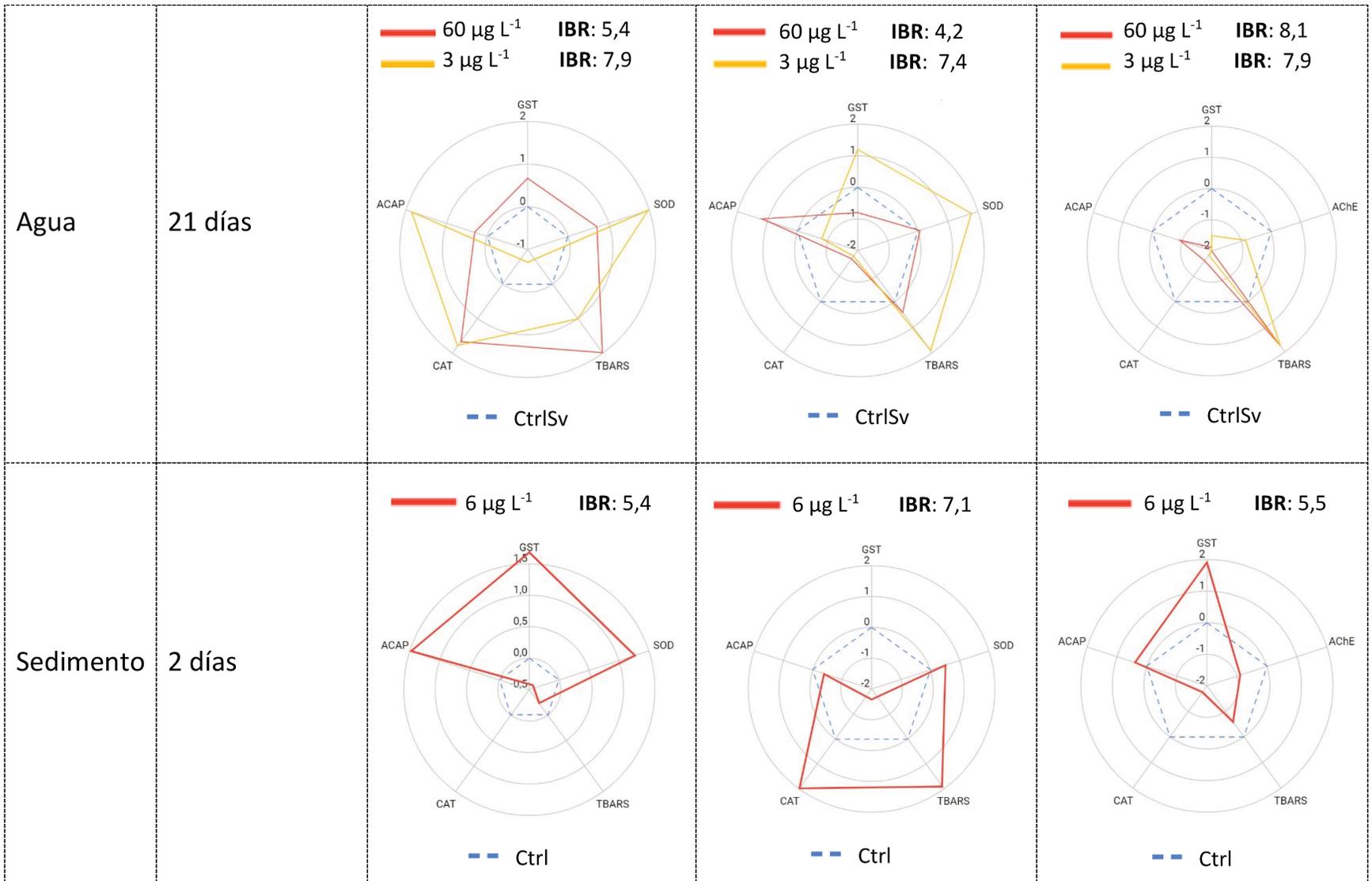
En las evaluaciones en sedimento, los biomarcadores en cerebro presentaron siempre un aumento en la actividad de GST. En hígado se observó que el aumento en el contenido de ACAP y de la actividad de SOD fueron constantes para ambos tiempos de exposición, mientras que en branquias fueron el aumento de TBARS y actividad de la CAT, así como la inhibición de GST.

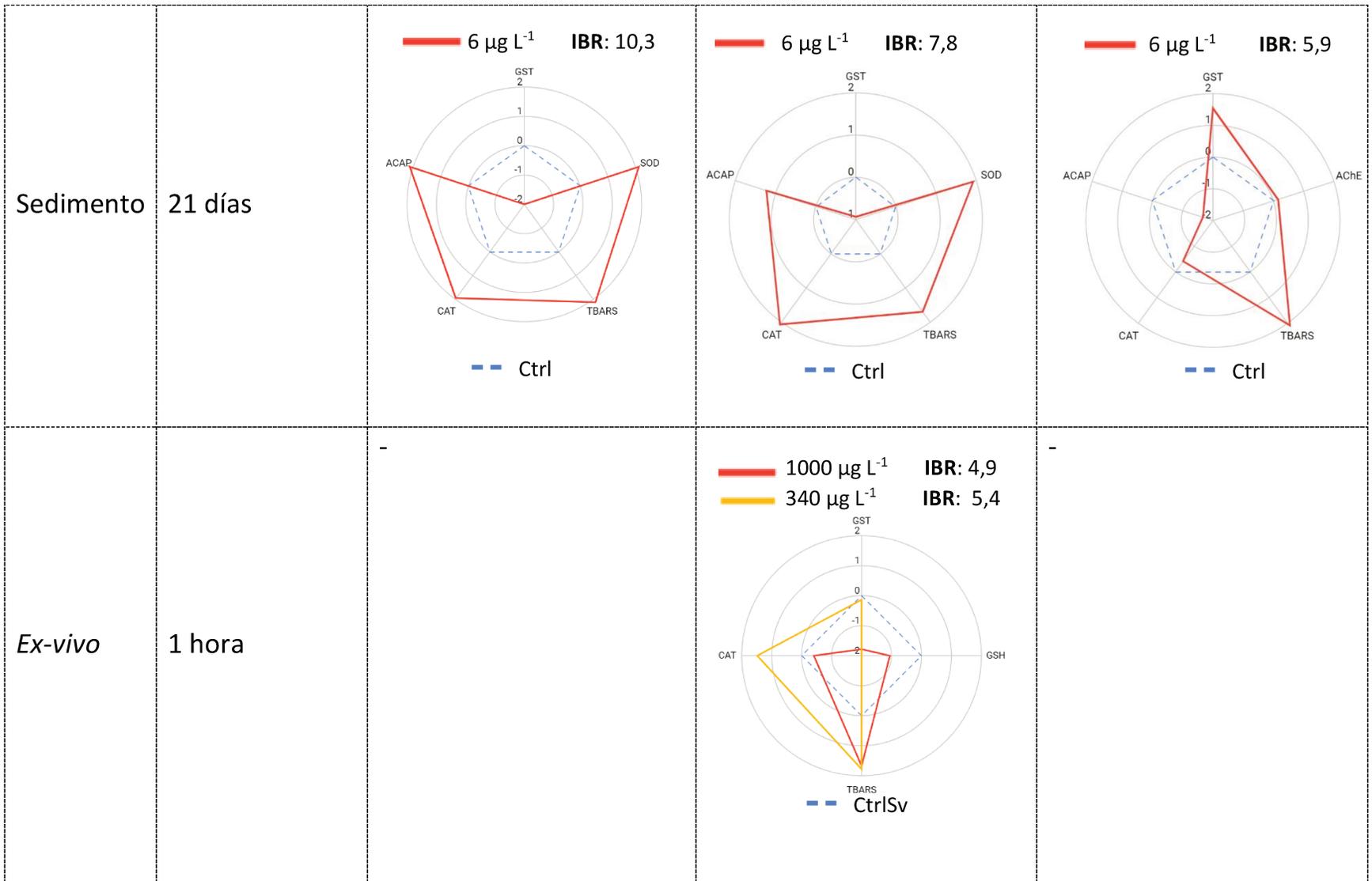
En relación con los valores de IBR obtenidos, el mayor valor se observó en el hígado de los peces expuestos a TCS en matriz sedimento durante 21 días, mientras que el menor valor se registró en branquias expuestas a TCS en agua durante 2 días. En relación a la exposición durante 21 días en agua, los mayores valores de IBR se observaron en hígado y branquias cuando los organismos estuvieron expuestos a la menor concentración ($3 \mu\text{g L}^{-1}$), mientras que en cerebro registró valores similares. Por otro lado, en branquias expuestas al bioensayo *ex vivo*, se observó un mayor valor de IBR a la menor concentración de TCS ($340 \mu\text{g L}^{-1}$).

En los organismos expuestos a sedimento, se observó que las branquias presentaron los mayores valores de IBR luego de 2 días de exposición, mientras que se registraron los mayores valores de IBR en los 3 órganos evaluados luego de 21 días de exposición a sedimento enriquecido con TCS.

Tabla 16. Gráficos de estrella y valores de IBR según el método de Sánchez et al. (2012) con marcadores bioquímicos analizados en hígado, branquias y cerebro de organismos adultos de *D. rerio* expuestos a TCS en diferentes matrices.

Matriz	Tiempo de exposición	Hígado	Branquias	Cerebro
Agua	2 días	<p> — 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ IBR: 7,3 — 189 $\mu\text{g L}^{-1}$ IBR: 8,0 </p> <p style="text-align: center;">— — CtrlSv</p>	<p> — 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ IBR: 7,9 — 189 $\mu\text{g L}^{-1}$ IBR: 4,8 </p> <p style="text-align: center;">— — CtrlSv</p>	<p> — 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ IBR: 4,2 — 189 $\mu\text{g L}^{-1}$ IBR: 6,3 </p> <p style="text-align: center;">— — CtrlSv</p>





8.4 Discusión

El análisis integral de los biomarcadores bioquímicos mediante dos métodos de estimación permitió comparar las respuestas diferenciales en los órganos de *D. rerio* luego de la exposición a TCS en tiempos, concentraciones y matrices diferentes. La estimación del IBR es una herramienta valiosa para resumir la respuesta de varios biomarcadores a condiciones estresantes en un solo valor.

En general, el valor de IBR aumenta con el aumento de los impactos de estrés en los peces. Considerando el análisis propuesto por Devin et al. (2014), los resultados mostraron un aumento de los valores de IBR en hígado de los peces expuestos durante 21 días en sedimento y agua, por lo que se evidencia un mayor impacto negativo de las diferentes concentraciones de TCS en dicho órgano. En este sentido, al considerar factores estresantes combinados (triclosán y pH), el aumento del valor de IBR en hígado también fue observado en *P. hypophthalmus* (Paul et al., 2020) y *C. auratus* (Li et al. 2018a).

El método modificado por Devin et al. (2014) considera una respuesta biológica esperable para un biomarcador, por lo tanto, si uno o más biomarcadores presentan respuestas diferentes a la esperada (de inhibición, activación, aumento/disminución), el valor de IBR también se ve modificado. Por lo tanto, los menores valores de IBR observados en hígado y cerebro de los peces expuestos durante 2 días en agua a TCS respecto a los grupos control se debieron a que la respuesta de los biomarcadores fueron diferentes a la esperada. De igual manera ocurrió con los valores de IBR en cerebro de los organismos expuestos TCS durante 21 días.

El índice de Sánchez et al. (2012) ha sido ampliamente utilizado para las evaluaciones ecotoxicológicas frente a diferentes contaminantes en bioensayos a campo y laboratorio (Barreto et al. 2018; Felicio et al. 2018; Sánchez-Hernandez et al. 2017; Sobjak et al. 2017; Vieira et al. 2014; 2016; 2018).

Los resultados de IBR estimados con el método de Sánchez et al. (2012) en la presente Tesis demostraron que varios biomarcadores se indujeron o inhibieron según la concentración y tiempo de exposición a TCS, mientras que los gráficos de estrella permitieron visualizar claramente qué biomarcadores fueron los más sensibles.

En hígado, TBARS resultó ser el biomarcador más sensible y significativo, con aumento en el contenido en cinco de las seis condiciones ensayadas. En este sentido, Vieira et al. (2016) observaron la misma tendencia en hígado de *Prochilodus lineatus* en ambientes perturbados por actividades agrícolas.

Por otra parte, la inhibición de CAT promovida en branquias y cerebro evidencia una respuesta consistente frente a la exposición del TCS en agua, independientemente del tiempo de exposición. El cerebro de los peces presentó la mayor heterogeneidad en los biomarcadores de estrés oxidativo y biotransformación debido al aumento de la capacidad total contra radicales peroxilos e inhibición de las enzimas observada en las exposiciones a TCS.

Al igual que con el método de Devin, hígado presentó en términos generales los mayores valores de IBR, respecto a branquias y cerebro. Sin embargo, la disparidad de las respuestas de biomarcadores observadas en los diferentes tejidos evidencia la importancia de la evaluación simultánea de diversos órganos.

Inicialmente, Beliaeff y Burgeot (2002) propusieron el análisis de IBR para cuantificar los efectos biológicos combinados de diferentes biomarcadores con el fin de seleccionar

biomarcadores sensibles para una evaluación precisa y eficaz del riesgo ecológico en el ambiente (Li et al. 2020). En este sentido, trabajos posteriores han mostrado la eficiencia de la integración de biomarcadores para la evaluación ambiental (Damiens et al. 2007, Sanchez et al. 2008, Vieira et al. 2014; 2016). El análisis de integración de los marcadores bioquímicos de la presente Tesis, demostró que en presencia de sedimentos fortificados con TCS las concentraciones ambientalmente relevantes de TCS ($3 \mu\text{g L}^{-1}$) y de MeTCS ($6 \mu\text{g L}^{-1}$) arrojaron valores más altos de IBR en hígado y branquias que en los organismos expuestos a concentraciones mayores. En este sentido, Barreto et al. (2018) analizaron los valores de IBR a partir de marcadores bioquímicos en hígado y branquias de *Sparus aurata*, donde reportaron valores elevados de IBR a concentraciones ambientalmente relevantes de gemfibrozil ($1,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Nuestros resultados demuestran que el análisis de IBR es una herramienta eficaz para identificar efectos a concentraciones de contaminantes a las que podrían estar expuestos los peces y para la evaluación de riesgo ambiental del TCS.

El índice de Beliaeff y Burgeot (2002) modificado por Devin, ha sido utilizado en diversos estudios orientados principalmente a la evaluación de sitios mayor o menormente contaminados, y de esta manera realizar una clasificación de los mismos de acuerdo a su gradiente de contaminación (Boudou et al. 2019; Dawood et al. 2021). Por lo tanto, el uso incorrecto de dicho índice puede llevar a consecuencias importantes con respecto a la evaluación de la salud de un ecosistema (Devin et al. 2014). Sin embargo, la dificultad del método radica en identificar la significancia de un biomarcador para un determinado sitio o tratamiento. En este contexto, el índice de IBR propuesto por Sánchez se ha utilizado para evaluaciones de riesgo ambiental (Vieira et al. 2014; 2016), así como para la evaluación de los efectos de toxicidad de un contaminante (O'donovan et al. 2020;

Teng et al. 2020), donde el grupo control o sitio de referencia es relativizado y contrastado con los tratamientos o sitios más perturbados, evidenciándose la consistencia o no de las respuestas individuales de cada marcador. Nuestros resultados permiten inferir que, para las evaluaciones de riesgo y toxicidad frente a un contaminante en condiciones controladas de laboratorio, donde existen grupos control, el índice de Sánchez et al. (2012) resulta ser más adecuado para obtener información respecto de la toxicidad del TCS en ensayos de laboratorio.

Capítulo VI: Evaluación de la respuesta de escape, recolonización y aislamiento a diferentes concentraciones de triclosán en juveniles de *D. rerio*

9.1 Introducción

Muchos organismos son capaces de detectar y evitar contaminantes antes de sufrir algún daño físico (Wells et al. 2004). La respuesta de huida o escape espacial es una capacidad de los organismos mediante la cual pueden evitar los factores de estrés ambiental, al pasar de un hábitat perturbado a otro menos perturbado. La evaluación de dicho comportamiento ha sido posible debido al cambio del enfoque de exposición forzada a uno de exposición multicompartimentado no forzada (Islam et al. 2019), transformándose así en una herramienta complementaria de los estudios de evaluación de riesgos ambientales (Araújo et al. 2018a, 2018b; Silva et al. 2017). El enfoque multicompartimentado simula escenarios en los que los contaminantes se distribuyen de forma heterogénea y a través de los cuales los organismos pueden moverse libremente, evitando así sus posibles efectos tóxicos. El sistema no forzado proporciona información, no sólo sobre los efectos de la contaminación dentro de un hábitat, sino también entre hábitats al considerar la conectividad y el desplazamiento de los organismos entre ellos (Araújo et al. 2018a). Asimismo, los modelos de comportamiento y distribución de especies en ambientes contaminados deben combinar el análisis de huida con el de preferencia por un hábitat (Araújo et al. 2018b). En este sentido, el comportamiento de preferencia se puede emplear ya que permite detectar qué tan repelente es un contaminante (Araújo et al. 2019).

Dado que los contaminantes pueden afectar la distribución espacial de los organismos, se espera que la contaminación pueda afectar los procesos de recolonización (ocupación de un hábitat por organismos que se mueven de un área no perturbada a otra perturbada). En este sentido, se plantea la hipótesis de escape-recolonización, la cual postula que las intensidades de las dos respuestas están inversamente correlacionadas

(Araújo et al. 2018a). Un hábitat que se “vacía” (debido a la emigración impulsada por factores estresantes como un contaminante) será recolonizado por poblaciones adyacentes tras una reducción suficiente de la intensidad del factor estresante a niveles inevitables. En este contexto, si los organismos evitan la contaminación, en un escenario en el que la contaminación divide dos hábitats menos perturbados, se pueden aislar los individuos (barrera química) y se evita el flujo entre poblaciones (Islam et al. 2019).

El escape debe considerarse como una respuesta subletal complementaria para mejorar la relevancia ecológica en la evaluación de los riesgos ambientales de los contaminantes (Moreira-Santos et al. 2008). Si bien los estudios que analizan los efectos de la contaminación sobre la distribución espacial de los organismos y sus procesos de preferencia de hábitat han sido considerados en la última década, no fueron lo suficientemente aplicados en estudios ecotoxicológicos para evaluar sustancias como el TCS. Por tanto, el aporte del presente estudio consiste en determinar las respuestas de escape espacial, recolonización y aislamiento al TCS en juveniles de *D. rerio*, para ser considerados como un enfoque complementario al de exposición forzada tradicional, mejorando así la relevancia ecológica de la evaluación de las condiciones ambientales.

9.2 Materiales y métodos

Con el objetivo de evaluar la respuesta de escape y preferencia de juveniles de *D. rerio* a TCS, en primer lugar, se realizó la calibración del sistema de exposición no forzado con y sin peces. Luego, se evaluó la respuesta de escape y preferencia con TCS. Posteriormente se determinaron las respuestas de recolonización y aislamiento por barrera química. Para ambas evaluaciones se realizaron las pruebas de control sin TCS y luego se procedió a la exposición de los juveniles con TCS.

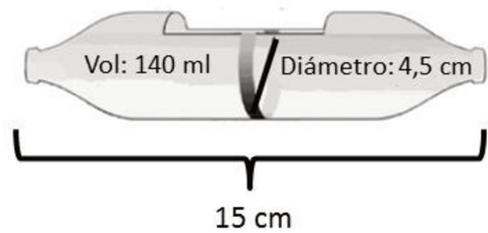
9.2.1 Obtención de organismos juveniles de *D. rerio*

Los ejemplares juveniles de *D. rerio* se obtuvieron en el laboratorio de GECAP a partir de la reproducción de organismos adultos propios. Los juveniles fueron alimentados con alimento vivo y en las condiciones detalladas en la sección 4.2.1, capítulo I. Para todos los bioensayos de comportamiento, se utilizaron ejemplares de entre 4 y 5 meses de vida y $1,6 \pm 0,9$ cm de largo.

9.2.2 Sistema de exposición multicompartimentado

Se desarrolló un sistema de exposición estático multicompartimentado no forzado y de libre elección basado en la metodología propuesta por Araújo et al. (2014). El sistema consistió en seis compartimentos interconectados, presentando en total una longitud total de 95 cm y un volumen máximo de 900 ml. Cada compartimento (Figura 34) se construyó con dos recipientes de polietileno de 100 ml de los que se retiraron las bases y se pegaron con pegamento (Sikaflex®, sellador para la construcción, Suiza). Cada compartimento tenía un volumen total de aproximadamente 150 ml, pero se llenó con 140 ml de solución, de modo que el volumen total de cada sistema era de 840 ml.

a)



b)

Sistema de exposición no forzado y multicompartimentado

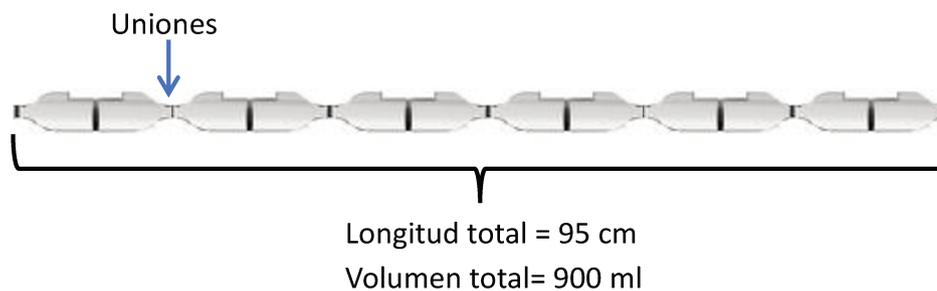


Figura 34. a) Compartimento individual del sistema de exposición, con detalles de sus medidas y volumen. b) Sistema de exposición no forzado multicompartimentado.

9.2.3 Calibración del sistema de escape

La calibración del sistema de escape consistió en verificar la estabilidad del gradiente de contaminación sin organismos. Para este propósito, se utilizó un gradiente de NaCl ya que su concentración puede ser inferida a través de la conductividad ($y = 2,2245x + 917$; $R^2 = 0,963$). En primer lugar, se preparó una solución de 110 mg L^{-1} de NaCl (considerada 100%) y a partir de ella se prepararon cinco concentraciones (20, 40, 60, 85 y 110 mg L^{-1}) más un control (0 mg L^{-1}) utilizando agua de red no clorada. Antes de colocar las diferentes soluciones de NaCl en el sistema, los compartimentos se aislaron entre sí con tapones de plastilina envueltos en parafilm. Se vertió un volumen de 140 mL de cada concentración de NaCl previamente preparada en su respectivo compartimento. Una vez que se llenaron todos los compartimentos, se retiraron los tapones, formando así un sistema de gradiente lineal (Figura 35).

Calibración del sistema con NaCl

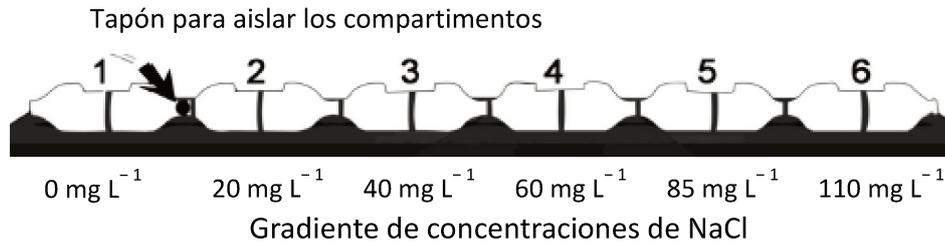


Figura 35. Sistema de exposición no forzado, multicompartimentado. La calibración se realizó con el gradiente de concentración de NaCl con y sin peces. Inicialmente los tapones se colocaron para mantener los gradientes hasta el comienzo del ensayo.

Dado que la presencia de peces en el sistema puede provocar una mezcla más rápida de las concentraciones y la interrupción del gradiente debido a sus movimientos de nado, se llevó a cabo un ensayo para comprobar que en las 2 horas de ensayo no se interrumpiera el gradiente de concentración. Cada sistema se preparó como se describió para la prueba de calibración con un gradiente de NaCl idéntico, ya que esas concentraciones no eran letales para los peces y los resultados podían compararse directamente. Antes de quitar los tapones, se agregaron tres peces a cada compartimento (18 peces por sistema). Después de 1 y 2 h, se registraron los valores de conductividad dentro de cada compartimento. El punto temporal de 2 h se eligió basándose en Araújo et al. (2014), quienes reporta este tiempo para el tamaño de los organismos utilizados en el presente estudio, así como para las dimensiones de los compartimentos del sistema. En el último registro de conductividad (2 h), se registró el número de organismos en cada compartimento para verificar la respuesta de escape de los peces al NaCl. Las observaciones se realizaron en condiciones de oscuridad utilizando luz roja para evitar la influencia del observador y la luz sobre el desplazamiento de los peces.

Antes de comenzar los ensayos de escape con TCS, se realizó un ensayo para verificar la distribución de los organismos en ausencia del contaminante. En este ensayo se espera que la distribución de los peces sea aleatoria, sin preferencia/escape de ningún compartimiento del sistema de prueba. Para este propósito, cada sistema se llenó con agua de red no clorada en todos los compartimentos.

9.2.4 Diseño experimental para la evaluación de escape y preferencia a un gradiente de concentración de TCS

La concentración más alta de TCS utilizada fue cercana al CL50 para *D. rerio* ($400 \mu\text{g L}^{-1}$) y se hicieron diluciones obteniéndose: 200, 100, 50, 2 y $0 \mu\text{g L}^{-1}$. Para ambos ensayos, escape control (sin contaminante, no se muestra la figura) y con TCS (Figura 36), se analizaron tres réplicas simultáneas del sistema. Para ello se colocaron tres peces en cada compartimento (18 organismos por réplica) que corresponde a la distribución inicial de los peces. La distribución de organismos a través del sistema (número de peces en cada compartimento) se registró cada 20 min durante las 2 horas de exposición (total de observaciones por réplica = 6).

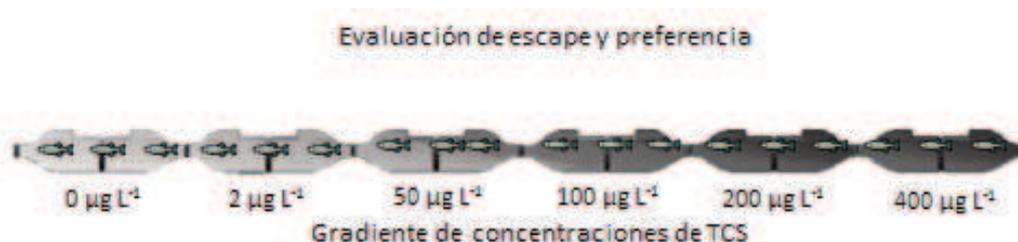


Figura 36. Sistema de exposición no forzado para la evaluación de escape y preferencia con organismos juveniles de *D. rerio*. Inicialmente se colocaron 3 peces en cada compartimento y luego se retiraron los tapones de las uniones. Se realizaron 3 réplicas del sistema (aquí se muestra una de esas réplicas).

9.2.4.1 Análisis estadístico

Para analizar los resultados de las pruebas de validación (determinación de la estabilidad del gradiente de NaCl en ausencia y presencia de peces) se utilizó ANOVA de una vía

considerando las concentraciones entre cámaras y luego se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$) entre las diferentes zonas. Por otro lado, para la determinación de la distribución aleatoria de peces en el grupo control, se empleó un análisis de varianza de diseño mixto. Para ello, los valores se transformaron en arcoseno y las observaciones en diferentes momentos se consideraron factores intrasujetos, mientras que las cámaras se trataron como factores intersujetos. Debido a las observaciones periódicas para la misma unidad experimental, la esfericidad de las mediciones repetidas se determinó mediante la prueba de Mauchly. Si se violaba la esfericidad (las varianzas de las diferencias no eran iguales: $p < 0,05$), se aplicaba la corrección de Greenhouse-Geisser para los grados de libertad. Cuando las diferencias de los resultados en relación con el tiempo de observación no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), los datos de distribución de organismos se agruparon considerando las medias de todos los tiempos. Los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS *Statistics*.

Luego se procedió a la evaluación de escape al gradiente de concentraciones de TCS. Para ello, el número de peces que escapan (*avoiders*) para cada compartimento se determinó mediante la fórmula propuesta por Moreira-Santos et al. (2008) que consiste en determinar la diferencia entre el número de organismos esperados (NE) y el número de organismos observados (NO): Número de peces que escapan = NE - NO. En este sentido, se asume que NE en el compartimento con la mayor concentración de TCS es igual al número de peces introducidos en el compartimento al comienzo de la prueba; para los compartimentos restantes, NE incluye los organismos introducidos inicialmente en el compartimento más los organismos introducidos en los compartimentos adyacentes de mayor concentración. Inicialmente, como cada compartimento tenía tres

peces, para el compartimento más contaminado, NE fue 3; sin embargo, para el compartimento adyacente (segundo compartimento), NE fue 6, y para el último (sexto) compartimento ($0 \mu\text{g L}^{-1}$) fue 18. El porcentaje de escape (*avoidance*) registrado en cada compartimento se calculó de la siguiente manera: $(\text{Avoiders}/ \text{NE}) \times 100$. Para calcular el escape, se combinaron las repeticiones ($n = 3$) para reducir la importancia de cada organismo (de otro modo, el escape de 1 organismo de los 3 introducidos representaría el 33%).

Se calculó la concentración que produce el 50% del escape de los organismos (AC50) y su respectivo intervalo de confianza (IC) utilizando el software PriProbit 1.63 (Sakuma, 1998).

Por otro lado, se determinó el % de preferencia de los organismos, para ello se asumió la fórmula propuesta por Araújo et al. (2018):

$$\% \text{ preferencia} = \frac{(\text{NOc} - \text{NEc})}{\text{NEc}} * 100$$

$$\text{NEc} = \frac{\sum_{i=1}^z \text{OBSERVADO}_i}{z}$$

Donde i representa el número de cada compartimento con $i= 1$ como primer compartimento, z es el número total de compartimentos y OBSERVADO_i es el número de organismos observados en cada compartimento al final del experimento. A partir de dicha fórmula, para la evaluación de preferencia, el NEc fue de $n=3$. En este contexto, la preferencia por un compartimento es negativa cuando se produce el escape, de modo que -100% significa que todos los organismos han abandonado el compartimento. La preferencia por un compartimento es positiva cuando el número de organismos observados supera el número esperado.

9.2.5 Diseño experimental para la evaluación de recolonización a un gradiente de concentración de TCS

Se desarrolló un sistema de exposición estático multicompartimentado (Figura 37) no forzado y libre elección idéntico al descrito en la sección anterior. El procedimiento utilizado para las pruebas de recolonización fue similar a la prueba de escape, excepto la distribución de organismos ($n = 18$), que se introdujeron inicialmente en el primer compartimento (no contaminado, $0 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS), en lugar de tres peces en cada compartimento. La prueba de recolonización control se realizó utilizando agua de red no clorada y la prueba de recolonización con gradiente de TCS con las mismas concentraciones que en el ensayo de escape: $0, 2, 50, 100, 200$ y $400 \mu\text{g L}^{-1}$. Se realizó el recuento de individuos en cada compartimento cada 20 min y durante 2 h, utilizando una luz roja.

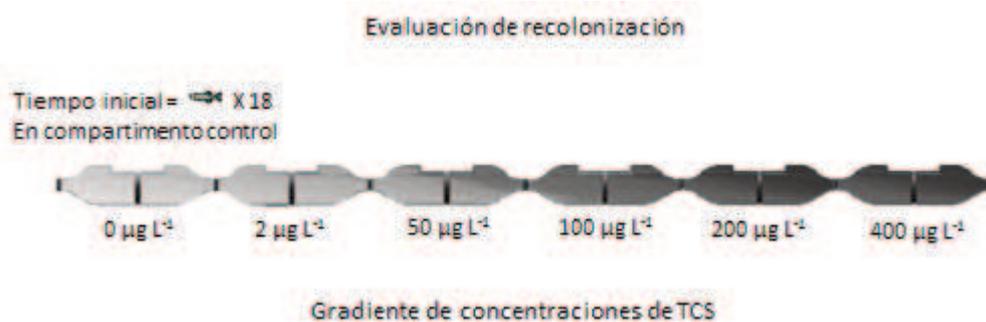


Figura 37. Sistema de exposición no forzado para la evaluación de recolonización con organismos juveniles de *D. rerio*. Inicialmente se colocaron 18 peces en el compartimento con agua de red no clorada (control) y luego se retiraron los tapones de las uniones. El sistema se realizó por triplicado.

9.2.5.1 Análisis estadístico

Para la determinación de la distribución aleatoria de peces en el grupo control, los resultados se analizaron mediante el análisis de varianza de diseño mixto descrito en la sección 9.2.4.1. Para el porcentaje de recolonizadores, se utilizó la fórmula descrita por Auraújo et al. (2018):

$$\% \text{ colonización} = \frac{NOc}{NEc} * 100$$

Se asume que NEc es el número de organismos esperados que recolonicen si la distribución fuera al azar (NEc = 3 por compartimento). El porcentaje de organismos observados se calculó con n total = 18 por réplica.

9.2.6 Diseño experimental para la evaluación de aislamiento por TCS

Los porcentajes de organismos en las pruebas de aislamiento se determinaron por zonas (Figura 38): zonas antes de la barrera, es decir los compartimentos previos al sitio con TCS, la “barrera química” con 300 µg L⁻¹ de TCS y la zona posterior a la barrera con TCS. La concentración de TCS se escogió por encontrarse dentro del rango de concentración del IC para la respuesta de escape (ver resultados) y menor que el valor de CL50 95 h para *D. rerio*.

En primer lugar, se determinó que la distribución de los organismos expuestos a condiciones control fuera al azar (ver sección 9.2.4.1). A partir de ello, con el ensayo con TCS se calcularon dos parámetros. Primero, la inhibición del movimiento a través de la barrera (solo se consideraron los organismos en los compartimentos 1 y 2, en %), que es el número de organismos que estuvieron en la zona previa a la barrera. En segundo lugar, la inhibición de cruzamiento (%), que es el número de organismos que alcanzaron la zona después de la barrera con TCS (solo se consideraron los organismos en los compartimentos # 5 y # 6). La evaluación se realizó por triplicado.



Figura 38. Sistema de exposición no forzado para la evaluación de asilamiento por barrera química con TCS en juveniles de *D. rerio*. Inicialmente se colocaron 18 peces en la zona anterior a la barrera (compartimento 1 y 2) luego se retiraron los tapones de las uniones. El sistema se realizó por triplicado, aquí se muestra uno de ellos.

9.2.6.1 Análisis estadístico

Para analizar los resultados se utilizó ANOVA de una vía considerando las medias de la zona previa, posterior y de barrera química con el TCS (%) y luego se utilizaron comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$) entre las diferentes zonas.

9.3 Resultados

9.3.1 Validación del sistema con NaCl y distribución de los organismos en ausencia del contaminante

En la Tabla 17 se indican los valores de conductividad sin peces. El gradiente de concentración de NaCl se mantuvo constante durante las 2 horas en el sistema multicompartimentado con diferencias significativas en las concentraciones entre los compartimentos.

Tabla 17. Gradiente de conductividad y concentraciones de NaCl sin peces luego de 2 horas en los diferentes compartimentos del sistema de exposición no forzado.

	Sin peces. Tiempo 2 h		
Compartimento	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Concentración de NaCl (mg L^{-1})	Concentración nominal
1	937 \pm 12	9 \pm 5 ^a	0
2	960 \pm 5	19 \pm 6 ^b	17
3	1033 \pm 3	52 \pm 1 ^c	50
4	1089 \pm 13	69 \pm 9 ^d	70
5	1098 \pm 4	81 \pm 6 ^e	90
6	1115 \pm 21	95 \pm 9 ^f	110

Los valores se muestran como media \pm desvío estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los compartimentos.

Del mismo modo, en presencia de peces (Tabla 18), el gradiente de NaCl no se interrumpió luego de 2 h, ya que las concentraciones de NaCl fueron significativamente diferentes entre los compartimentos ($p < 0,05$).

Tabla 18. Gradiente de conductividad y concentraciones de NaCl con peces luego de 1 y 2 horas de exposición al gradiente en el sistema de exposición no forzado.

Con peces				
Compartimento	1 h		2 h	
	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Concentración de NaCl (mg L^{-1})	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Concentración de NaCl (mg L^{-1})
1	950 \pm 14	10 \pm 6	970 \pm 19	17 \pm 2 ^a
2	977 \pm 18	27 \pm 8	994 \pm 8	32 \pm 4 ^b
3	1014 \pm 22	51 \pm 10	1010 \pm 14	41 \pm 6 ^b
4	1070 \pm 14	64 \pm 6	1067 \pm 2	67 \pm 1 ^c
5	1099 \pm 1	82 \pm 0,3	1094 \pm 1	80 \pm 1 ^d
6	1123 \pm 1	93 \pm 1	1132 \pm 18	91 \pm 8 ^e

Los valores se muestran como media \pm desvío estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los compartimentos.

Al estudiar la distribución de los peces en el sistema control, se verificó que los mismos se distribuyeron de manera aleatoria (Figura 39) entre los compartimentos en la prueba de escape y no se observaron diferencias significativas en la presencia de los peces entre compartimentos ($p=0,240$).

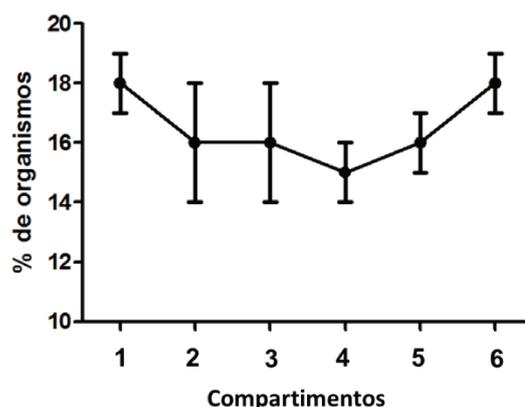


Figura 39. Distribución en % de organismos (\pm DE) de *D. rerio* en la prueba de escape sin contaminante.

9.3.2 Evaluación de escape a TCS

La distribución (en %) de organismos que escapan y observados luego de la prueba de escape a TCS se muestra en la Figura 40. El porcentaje de organismos en cada compartimento no varió significativamente con el tiempo, pero varió con la

concentración. A $200 \mu\text{g L}^{-1}$ y $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS se observaron los mayores porcentajes de escape, 57% y 75% respectivamente. La distribución de organismos observados fue significativamente menor a partir de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ (10 y 4 % en $200 \mu\text{g L}^{-1}$ y $400 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente). El valor AC50 del TCS para juveniles de *D. rerio* fue de $141 \mu\text{g L}^{-1}$ (IC: 53- 638).

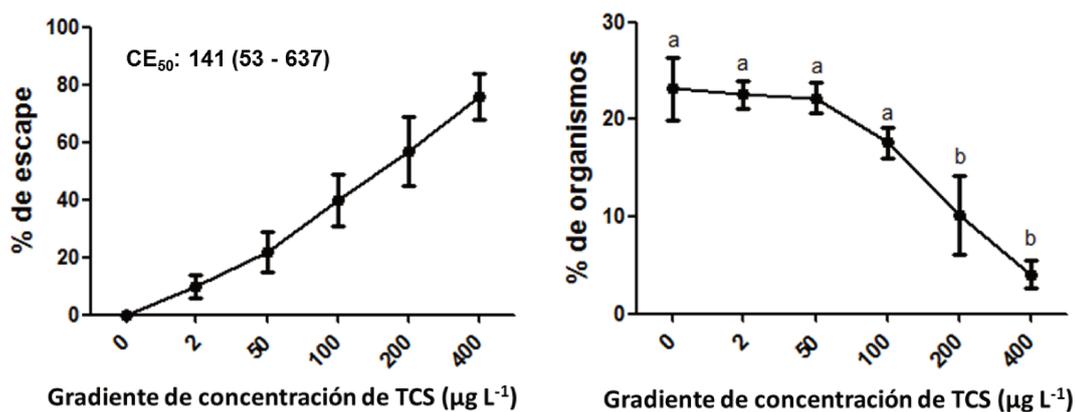


Figura 40. Porcentajes (\pm desviaciones estándar) de respuesta de escape (A) y organismos (B) luego de la exposición al gradiente de TCS. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para la distribución de los organismos en la prueba de escape.

9.3.2.1 Evaluación de preferencia a TCS

La preferencia de los peces difirió significativamente en las dos concentraciones más altas de TCS (200 y $400 \mu\text{g L}^{-1}$) luego de las 2 h de ensayo (Figura 41). Se observó una tendencia gradual a preferir compartimentos con bajas concentraciones (0, 2, 50 y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS).

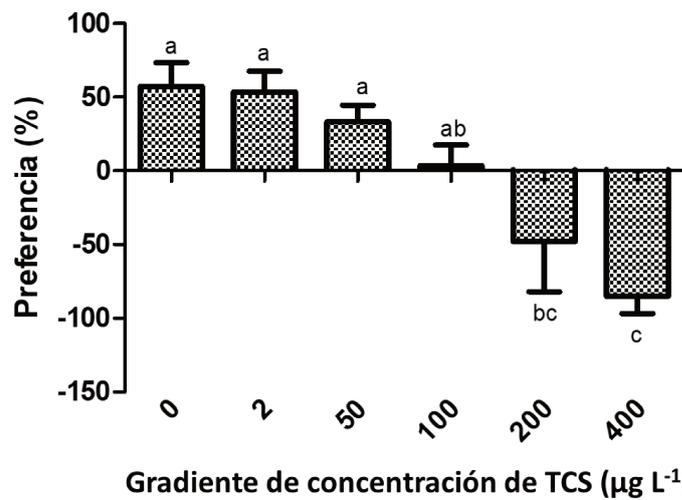


Figura 41. Porcentaje de preferencia (\pm desvío estándar) de los peces expuestos a un gradiente de concentración de TCS luego de 2 h de exposición. Letras diferentes indican medias significativamente diferentes.

9.3.3 Evaluación de recolonización

Con la ausencia de contaminante (control), los peces exhibieron una distribución uniforme a lo largo de los seis compartimentos (Figura 42), la cual no varió significativamente con los tiempos de observación.

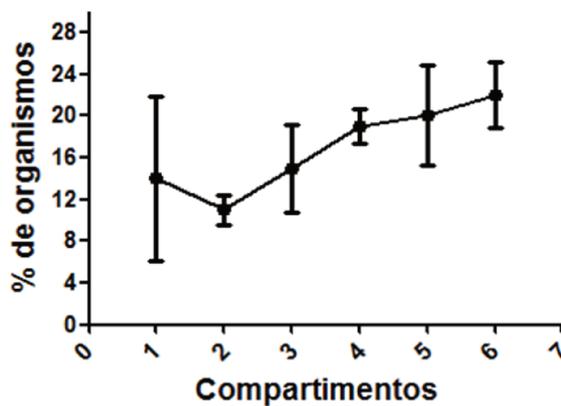


Figura 42. Distribución en % de organismos (\pm desvío estándar) de *D. rerio* en la prueba de recolonización sin contaminante.

En evaluación de recolonización con TCS, la distribución de los organismos en los compartimentos fue significativamente diferente y sin dependencia de los tiempos de observación. El número de recolonizadores se redujo con el aumento de las concentraciones de TCS, con diferencias significativas en la mayor concentración de TCS (Figura 43).

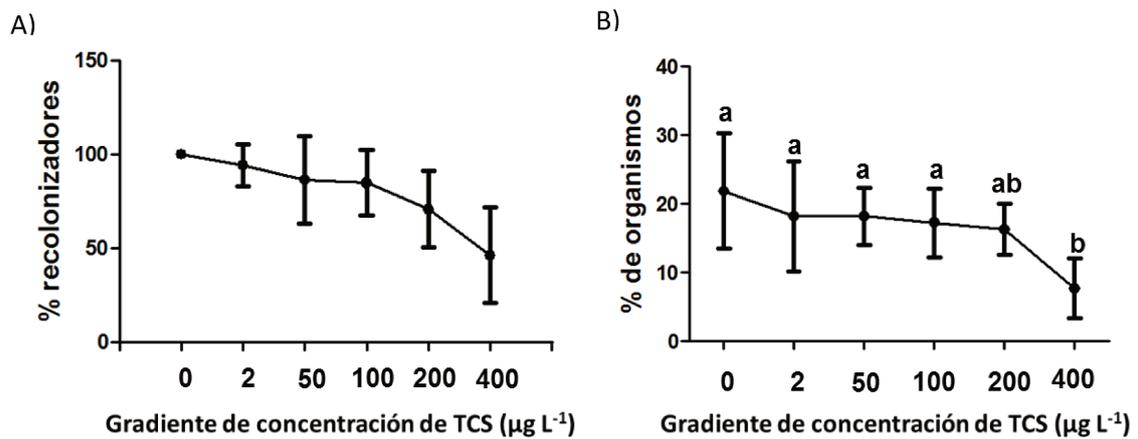


Figura 43. Porcentajes (\pm desvío estándar) de respuesta de recolonización (A) y organismos (B) luego de la exposición al gradiente de TCS. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para la distribución de los organismos en la prueba de recolonización.

9.3.4 Evaluación de aislamiento al TCS

En la Figura 44 se muestra la distribución de los peces para los 3 sectores: sitio antes de la barrera, la barrera con 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS y el sitio posterior a la barrera. Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de individuos que estuvieron en el sitio posterior a la barrera, con respecto al sitio con TCS y anterior a éste. El 53 % de los organismos atravesaron el sitio con la concentración de TCS y se mantuvieron en el sitio posterior, mientras que el 21% se encontró en el sitio con TCS y el 26% restante estuvieron en el sitio anterior al punto contaminado con TCS.

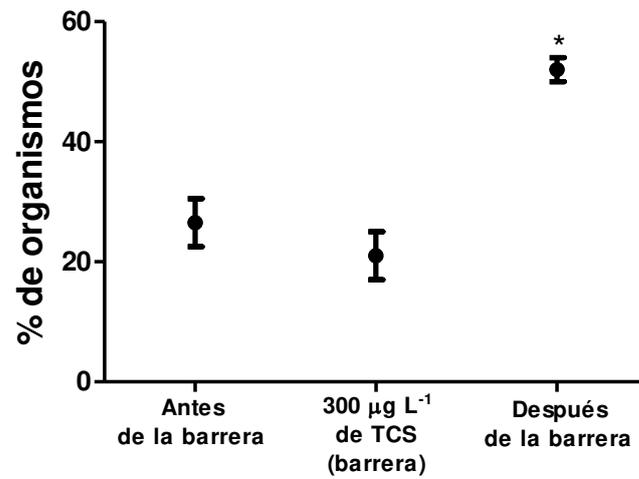


Figura 44. Porcentaje medio (\pm desvío estándar) de organismos distribuidos a lo largo de las tres zonas del ensayo de aislamiento. Aguas abajo (los dos primeros compartimentos); la barrera química representa la zona que contiene una concentración de TCS de $300 \mu\text{g L}^{-1}$; y después de la barrera. *Indica diferencias significativas entre sitios.

9.4 Discusión

Numerosos estudios han evaluado la respuesta de escape luego de la exposición a contaminantes tales como el cobre, pirilmetanil y bisfenol A (Araújo et al. 2014; 2018a; 2018b; Silva et al. 2018). En el presente trabajo, el escape de organismos juveniles de *D. rerio* a concentraciones de TCS se evidenció a partir de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Silva et al. (2017) reportaron una respuesta en organismos de *Poecilia reticulata* luego de exposiciones a gradientes de TCS. En este sentido, el escape serviría como una alerta temprana para evitar la exposición a TCS. Este tipo de respuestas puede tener importantes implicaciones ecológicas al alterar las comunidades en el agua receptora de forma directa (Araújo et al. 2016). Asimismo, los resultados permiten afirmar que los organismos juveniles de *D. rerio* no evitan la exposición a concentraciones inferiores a $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, por lo que los peces podrían estar expuestos a concentraciones inferiores (y ambientalmente relevantes) sin presentar respuesta de escape. La preferencia de los organismos a las concentraciones de TCS estuvo en el rango de 0 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, luego de los $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, los organismos no prefirieron dichos sitios, lo que confirma que concentraciones inferiores a $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS son exposiciones no forzadas para organismos juveniles de *D. rerio*.

En relación con la evaluación de recolonización de juveniles de *D. rerio*, nuestros resultados demuestran que la recolonización disminuyó a medida que aumentaba la concentración de TCS. La ausencia de diferencias entre las concentraciones $200\text{-}400 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS permite considerar dicho rango como ausencia de colonización, coincidiendo con el valor observado en la respuesta de escape. Nuestros resultados concuerdan con lo propuesto por Araújo et al. (2018a) para las respuestas de escape-colonización, las cuales están inversamente correlacionadas. Un sitio que se evita puede no ser

colonizado por los organismos hasta que no disminuya la intensidad del factor estresante (concentración de TCS) hasta niveles inevitables. Islam et al. (2019) evaluaron la respuesta de recolonización de juveniles de *D. rerio* expuestos a gradiente de concentración de cobre y observaron que 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre fueron suficientes para disminuir la capacidad de recolonización de los organismos.

En la respuesta de aislamiento por barrera química por TCS, los resultados permitieron demostrar que 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS resulta en una barrera efectiva para aislar a los organismos, debido a que el 50% de los organismos no volvieron a atravesarla. Una posible interpretación es que la elevada densidad inicial de organismos en los compartimientos 1 y 2 puede llegar a actuar como una eficaz inercia impulsora para atravesar una concentración no letal de TCS, no obstante, la posibilidad de atravesarla nuevamente se ve limitada actuando como una barrera química capaz de generar una respuesta de escape hacia las nuevas condiciones del sistema. Soares Guidony Pereira et al. (2021) evaluaron los efectos de la exposición a 100 y 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS en peces adultos de *D. rerio* luego de 96 h, y observaron que el TCS no afectó la función quimio sensorial olfativa y el comportamiento de los peces. En este sentido, estos autores interpretaron que dicha función quimiosensorial olfativa pudiera ser condicionante de una respuesta de escape/detección del contaminante en ejemplares adultos de *D. rerio* a partir de concentraciones mayores a las indicadas. Por su parte, nuestros resultados indicarían que una respuesta de escape puede ser detectable en juveniles a partir de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por lo tanto, nuestros resultados indicarían la existencia de una respuesta de escape en juveniles de *D. rerio*. comprendida dentro del mismo rango de concentraciones aunque levemente menor que pudiera estar vinculada con la activación de dicha función quimiosensorial. Asimismo, podrían estar actuando otros mecanismos

de detección en juveniles, diferentes a los estudiados en adultos, que permita explicar los resultados obtenidos. Araújo et al. (2018a) observaron que el 51% de *Poecilia reticulata* presentó una reducción en el potencial migratorio al exponerse a una barrera química de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina. Asimismo, Islam et al. (2019) analizaron una reducción en la migración de *D. rerio* del 41,3% cuando se expusieron a una barrera química de cobre de $90 \mu\text{g L}^{-1}$.

La fragmentación de la distribución de los organismos por una barrera química podría ser incorporado para las evaluaciones de riesgo ambiental, ya que las consecuencias pueden ser significativas, tales como aislamiento de la población, discontinuidad del hábitat y aumento de la vulnerabilidad de las poblaciones (Islam et al. 2019; Fuller et al. 2015). El comportamiento animal es una característica importante para comprender su adaptación al ambiente. En este contexto, el presente trabajo demostró la capacidad de los peces en evitar concentraciones de TCS, lo cual evidencia la importancia de realizar bioensayos de exposición no forzada que permiten obtener una visión realista de los efectos de un contaminante sobre el comportamiento de los peces.

**Capítulo VII: Evaluación de la exposición
a triclosán en estadios tempranos del
desarrollo de *D. rerio***

10.1 Introducción

A partir de la década de 1990, se establecieron protocolos para la evaluación de la toxicidad aguda, crecimiento y los efectos a corto plazo en las primeras etapas de vida de *D. rerio* (Oliveira, 2009). En la última década, se realizaron numerosos cambios de los protocolos iniciales con relación a los bioensayos con peces y protocolos de bioética que permitieron mejorar los criterios de valoración de la toxicidad de los compuestos. Entre dichas modificaciones se incluyen la implementación de la Evaluación de Toxicidad en Embriones (FET por sus siglas en inglés), donde se encuentran estandarizadas las condiciones para bioensayos en la evaluación de contaminantes sobre embriones de peces (OECD, 2006; 2013). Si bien el periodo embrionario de *D. rerio* culmina con la eclosión de las larvas (Kimmel et al. 1995), el FET permite la exposición de las mismas hasta un máximo de siete días post fecundación (dpf).

El FET surge como una alternativa a nivel internacional (ISO 15088-2007) para la determinación de la toxicidad de las sustancias y ha sido modificado por la OECD, (2013) para *D. rerio*. En la actualidad, la comunidad científica utiliza el protocolo FET OECD 236, para la evaluación de la ecotoxicidad de muchas sustancias. El mismo, permite el seguimiento de una amplia gama de puntos finales, no sólo efectos letales sino también de efectos subletales que proporcionan mayor información sobre el modo de acción de las sustancias y sus posibles riesgos ecológicos. De esta forma, los efectos se pueden observar, por ejemplo, a través de los latidos del corazón, la pigmentación o el desarrollo de los ojos, entre otros (OECD, 2013).

Numerosos autores han informado efectos promovidos por el TCS sobre biomarcadores de estrés oxidativo y malformaciones en embriones de peces (Araújo et al. 2019; Gomes et al. 2021; Macedo et al. 2017; Oliveira et al. 2009; Parenti et al. 2019; Song et al. 2020;)

y anfibios (Chai et al. 2016; Martins et al. 2017). Sin embargo, no se han abordado los efectos generados por el TCS sobre los biomarcadores de respuestas tempranas y malformaciones en *D. rerio* durante el desarrollo embrionario, eclosión y luego de la eclosión. En este sentido, el objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto del TCS sobre biomarcadores morfológicos, de estrés oxidativo y neurotoxicidad en estadios tempranos de *D. rerio*, así como determinar y comparar los niveles basales en los biomarcadores bioquímicos (estrés oxidativo y neurotoxicidad) entre los organismos de 48, 72, 96 y 168 horas no tratados con TCS.

10.2 Materiales y métodos

A partir de lo analizado en diferentes metodologías FET (Lammer et al. 2009), se optó por la descrita por Braunbeck y Lammer (2006) con modificaciones de la OECD (2013).

En el laboratorio de GECAP se ajustaron las condiciones de recolección y manejo de embriones adoptándolas a la metodología antes mencionada.

10.2.1 Diseño experimental para la determinación de parámetros biomarcadores

Con el fin de responder al objetivo propuesto, se realizó un ensayo semiestático con embriones de *D. rerio* durante 48, 72, 96 y 168 horas de exposición a concentraciones subletales de TCS (Figura 45). Para ello, se colocaron 20 huevos viables con un tiempo no mayor a las 6 horas postfecundación (hpf) en placas plásticas (poliestireno) de 6 pocillos (*wells*) que contenían medio estandarizado según norma ISO 7346 (294 mg L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 123,3 mg L⁻¹ MgSO₄*7H₂O; 63 mg L⁻¹ NaHCO₃; 5,5 mg L⁻¹ KCl), a temperatura constante de 25 °C, fotoperiodo 12L/12D. De esta forma la fase de exposición a las soluciones experimentales se correspondió con los tiempos de vida de los animales: 48, 72, 96 y 168 h. Por ejemplo, a 48 h se colectaron los individuos de 48 h de vida de todos los tratamientos, a 72 h se colectaron los de 72 h de vida y así sucesivamente con los tiempos restantes. Las soluciones de TCS se prepararon a partir de una solución stock en metanol (0,003% v/v). Se realizó un recambio diario de los medios experimentales durante todo el ensayo con el objetivo de mantener constante las concentraciones de TCS. Los tratamientos experimentales ensayados fueron: Ctrl, CtrlSv, 18 µg L⁻¹ (TCS1), 38 µg L⁻¹ (TCS2) y 75 µg L⁻¹ (TCS3). Las concentraciones de TCS fueron 3/4, 5/4 y 7/4 más bajas que la reportada para alteraciones bioquímicas promovidas por le TCS en organismos de 168 hpf de *D. rerio* (Falisse et al. 2017). Los tiempos de exposición se escogieron con el objetivo de incluir el proceso de desarrollo embrionario antes, durante

y luego de la eclosión de los embriones. Por cada tratamiento se realizaron 6 réplicas (Figura 45), y a partir de cada réplica se evaluaron los biomarcadores. Por cada tiempo de exposición, se midieron las actividades enzimáticas de CAT, GST y AChE; y contenido de ACAP, GSH y TBARS. Para ellos, las muestras de embriones/larvas fueron homogeneizadas para obtener la fracción post mitocondrial respetando lo descrito en la sección 4.2.3, capítulo I.

Finalmente, con el objetivo de observar posibles alteraciones morfológicas durante el desarrollo embrionario, particularmente entre el tiempo de eclosión (72 y 96 hpf), se registraron las siguientes características: desvío de la columna vertebral, alteraciones oculares, pigmentación del cuerpo y número de latidos del corazón por minuto. Para ello, se registraron la presencia o ausencia de alteraciones de dichos parámetros en base a protocolos validados previamente (Lammer et al. 2009; Ribeiro et al. 2015). El número de latidos del corazón se midió por duplicado para cada tiempo y tratamiento durante 15 segundos y los datos se convirtieron a latidos por minuto ($n = 80$). Las observaciones se realizaron con una lupa estereoscópica con aumento máximo de 50X.

Luego de cada periodo de exposición, las larvas fueron pesadas y sacrificadas ubicándolas en criotubos a -20°C , y conservadas a -80°C hasta el momento de su procesado.

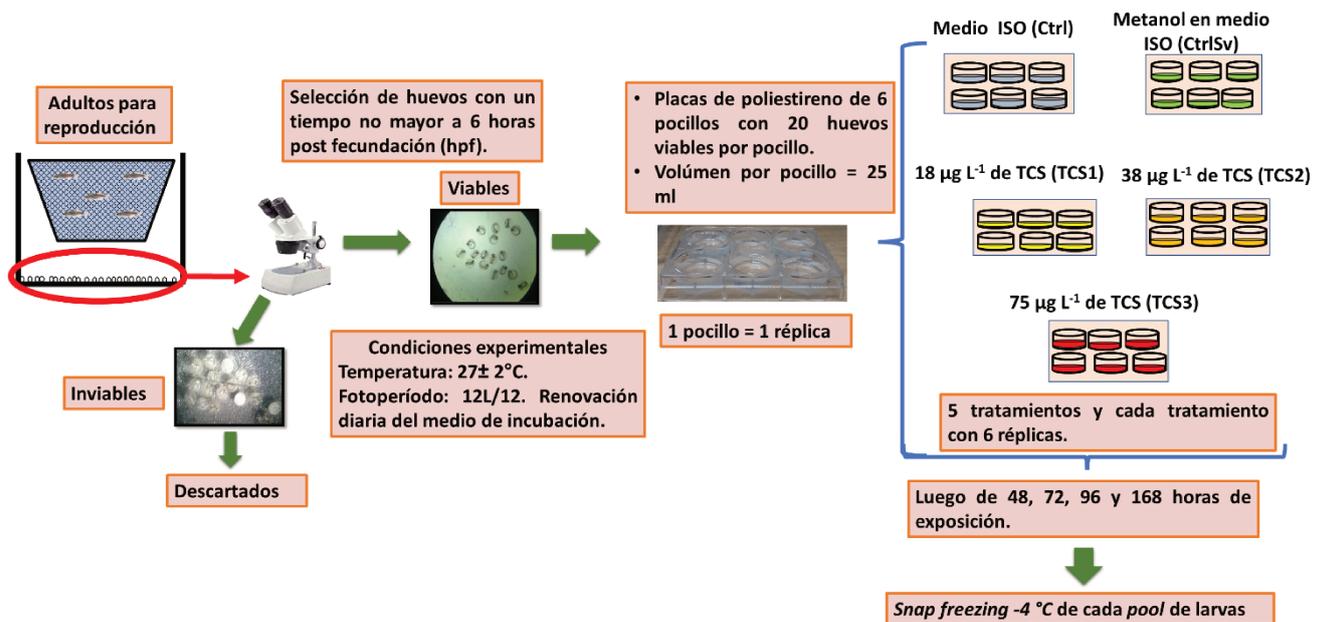


Figura 45. Diseño experimental de exposición de estadios tempranos del desarrollo de *D. rerio* a concentraciones subletales de TCS.

10.2.2 Mediciones analíticas del TCS en agua

Para la determinación de las concentraciones de TCS, se tomaron 3 muestras de agua de cada tratamiento durante el bioensayo ($n = 15$). La metodología de medición, así como el equipamiento fueron los mismos a los detallados en la sección 5.2.4, capítulo II.

10.2.3 Análisis estadístico

Se determinó la normalidad y la homogeneidad de la varianza de los datos con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias significativas entre los tratamientos se evaluaron mediante ANOVA de una vía y para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Tukey ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó mediante el software InfoStat (Di Rienzo et al. 2012).

Con el objetivo de obtener una visión general de las respuestas biológicas y poder definir los parámetros más importantes involucrados en la toxicidad del TCS durante el desarrollo de *D. rerio*, se realizó un ACP para cada periodo de exposición. Para ello, utilizó el mismo n que para en análisis de ANOVA (6 por tratamiento) y el análisis

estadístico se realizó mediante el software mencionado anteriormente. Para la interpretación de los ACP, se siguió la metodología según Legendre y Legendre (1979) descrita en la sección 5.2.5, capítulo II.

Además, para analizar el efecto integrador sobre los biomarcadores promovidos por el TCS, se utilizó el índice IBR descrito por Beliaeff y Burgeot (2002) con modificaciones según Sánchez et al. (2012). El detalle de la metodología se describió en la sección 8.2.2, capítulo V. Los gráficos de estrella se realizaron considerando el valor medio de cada tratamiento y contribuyeron a observar cuánto difería el grupo tratado del grupo CtrlSv. La estimación del índice de Sánchez et al. (2012) y los gráficos de estrella se realizaron según lo descrito en la sección 8.2.2, capítulo V.

10.3 Resultados

10.3.1 Concentraciones efectivas de TCS

Las concentraciones efectivas de TCS durante la exposición fueron TCS1: $25,1 \pm 5 \mu\text{g L}^{-1}$; TCS2: $47,0 \pm 6 \mu\text{g L}^{-1}$ y TCS3: $86,5 \pm 14 \mu\text{g L}^{-1}$. No se detectó TCS en las muestras de agua de los tratamientos Ctrl y CtrlSv.

10.3.2 Biomarcadores morfológicos y fisiológico

En la Tabla 19 se muestran las alteraciones morfológicas y ritmo cardíaco en embriones y larvas de *D. rerio* de 72 y 96 h de exposición, respectivamente. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas entre los controles y los organismos expuestos a TCS.

Tabla 19. Biomarcadores morfológicos y fisiológicos registrados para larvas de *D. rerio* luego de 72 y 96 h.

	Tratamientos	Malformaciones de la columna	Alteraciones oculares	Ausencia de pigmento	Ritmo cardíaco
72 h	Ctrl	0	0	0	135 ± 8
	CtrlSv	$0,08 \pm 0,30$	0	$0,25 \pm 0,46$	137 ± 11
	TCS1	0	0	0	149 ± 13
	TCS2	0	0	$0,75 \pm 1,40$	148 ± 15
	TCS3	0	0	0	148 ± 14
96 h	Ctrl	$0,17 \pm 0,30$	0	$0,38 \pm 0,52$	147 ± 9
	CtrlSv	0	0	$1,00 \pm 1,60$	148 ± 11
	TCS1	0	0	$0,50 \pm 0,53$	154 ± 6
	TCS2	$0,04 \pm 0,20$	0	$0,88 \pm 0,83$	153 ± 8
	TCS3	$0,04 \pm 0,20$	0	$1,50 \pm 0,93$	167 ± 6

Los valores se muestran como media \pm desvío estándar.

10.3.3 Cambios de los niveles basales en los biomarcadores

En la Figura 46 se muestran los cambios en los niveles basales de los biomarcadores en peces control de diferentes estadios tempranos del desarrollo. En los niveles de TBARS,

se observaron diferencias significativas entre los individuos de 48 hpf frente al resto de los estadios, y las larvas de 168 hpf se diferenciaron de los organismos de 72 y 96 hpf. La actividad de GST fue mayor en larvas de 168 hpf, mientras que la de CAT no se diferenció entre los estadios evaluados. El contenido de GSH fue menor en los organismos de 24 hpf respecto a los de 72 y 96 hpf. La actividad de AChE aumentó significativamente en peces de 72, 96 y 168 hpf respecto a los embriones de 48 hpf. Respecto a ACAP, no se observaron diferencias entre los diferentes estadios evaluados.

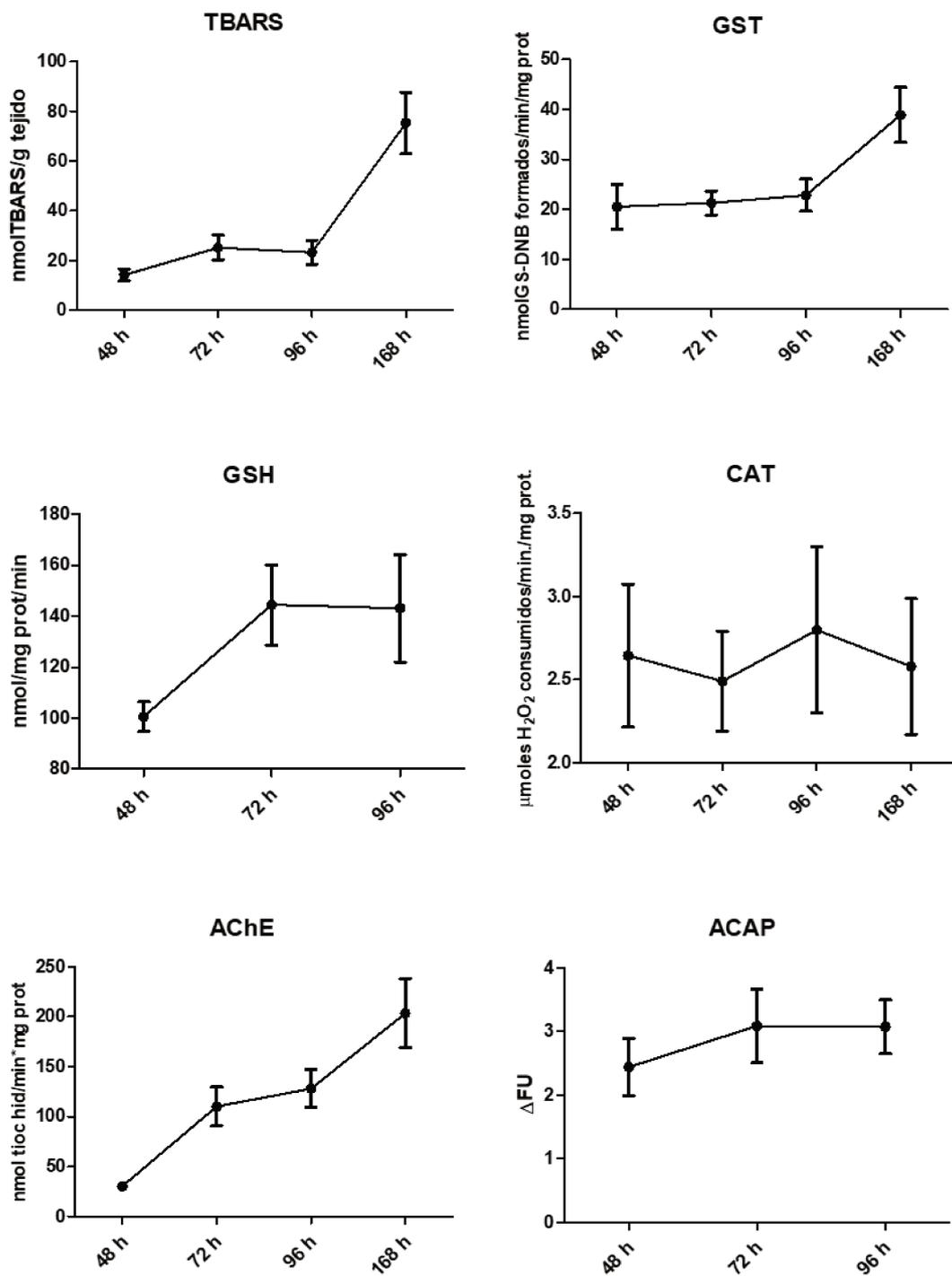


Figura 46. Niveles basales de los biomarcadores en peces no expuestos (Ctrl) a lo largo de 48, 72 y 96 hpf. Los valores se expresan como media \pm desvío estándar.

10.3.4 Biomarcadores de estrés oxidativo, biotransformación y neurotoxicidad

En la Figura 47 se muestran los biomarcadores de los estadios tempranos del desarrollo de *D. rerio* luego de las exposiciones a TCS relativizados al CtrlSv. La actividad de la GST aumentó en larvas de 168 hpf en las 2 concentraciones más altas de TCS (TCS2 y TCS3). No se observaron diferencias significativas entre los grupos Ctrl y CtrlSv en todos los biomarcadores y tiempos evaluados.

Respecto a la actividad de CAT, se observó un aumento en la actividad en todos los estadios evaluados en TCS2 y TCS3, y en organismos de 72 y 96 hpf también se evidenció un aumento luego en TCS1. La actividad de AChE se inhibió en larvas expuestas durante 96 y 168 hpf para las 2 concentraciones de TCS. El contenido de GSH disminuyó en las tres concentraciones de TCS ensayadas luego de 48 y 72 h de exposición. En relación a TBARS, no se observaron diferencias a las 48 horas de exposición a TCS, sin embargo, luego 72 y 96 h de exposición a TCS3 se observó un aumento de TBARS y en larvas de 168 hpf aumentó en TCS2 y TCS3. ACAP disminuyó en embriones de 48 y 96 hpf expuestos a TCS3, mientras que en resto de las concentraciones no se observaron diferencias significativas.

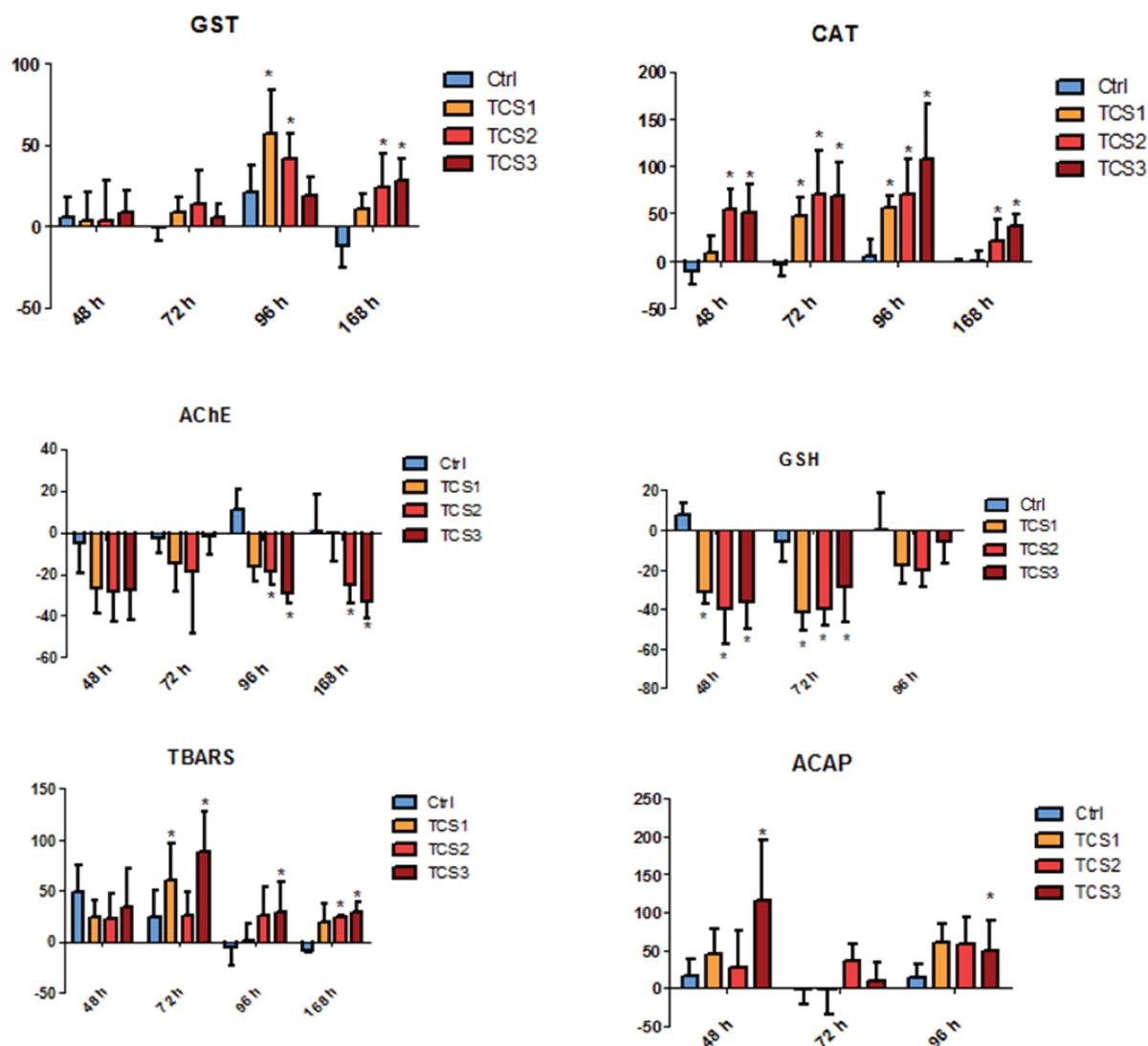


Figura 47. Niveles de los biomarcadores evaluados en organismos expuestos 48 h a 168 h a TCS, relativizadas a CtrlSv. La media del CtrlSv para cada período y concentración ensayada corresponde al nivel 0 del eje y, y los gráficos de barras muestran los niveles (en porcentajes) para cada tratamiento respecto a su CtrlSv.

10.3.5 Análisis de componentes principales

Los ACP para cada periodo de exposición se muestran en la Figura 48. En todos los casos el CP1 permitió agrupar los organismos control (Ctrl y CtrlSv) respecto de los organismos tratados con TCS. Las tres concentraciones no se diferenciaron entre sí, a excepción de los individuos expuestos a la menor concentración de TCS luego de 168 h, que se agruparon con los organismos control.

A 48 y 72 h de exposición, los CP1 y CP2 explicaron el 58% del ordenamiento de los datos, es decir la separación de los grupos tratados con TCS de los grupos control. Para la exposición de 48 h los biomarcadores que explicaron significativamente dicho agrupamiento fueron CAT y ACAP en el CP1 y TBARS y AChE en el CP2. En los embriones expuestos durante 72 h los biomarcadores que explicaron la variabilidad fueron TBARS, GSH y CAT en el CP1 y GST en el CP2.

A las 96 horas se observó la mayor diferencia entre los tres grupos tratados y controles, no evidenciándose diferencias entre los grupos expuestos a TCS. El CP1 y CP2 explicaron el 61% de la variabilidad de los datos y estuvo relacionado significativamente con la actividad de CAT y AChE en el CP1.

Respecto a los organismos expuestos durante 168 h, los dos primeros componentes explicaron el 78% de la variabilidad de los datos y en el CP1 todos los biomarcadores (CAT, TBARS, GST y AChE) explicaron significativamente el agrupamiento, mientras que en el CP2 fue la actividad de AChE.

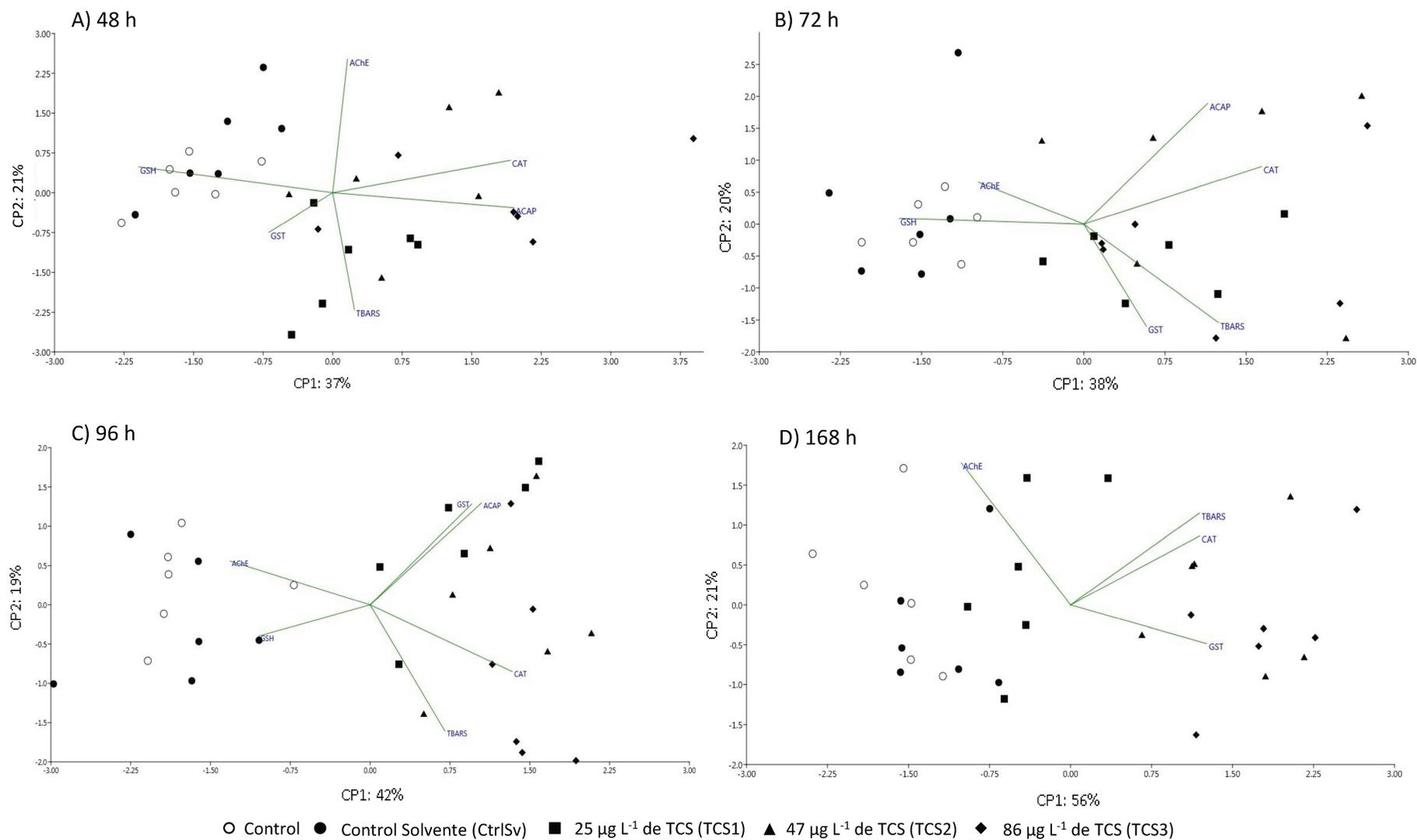


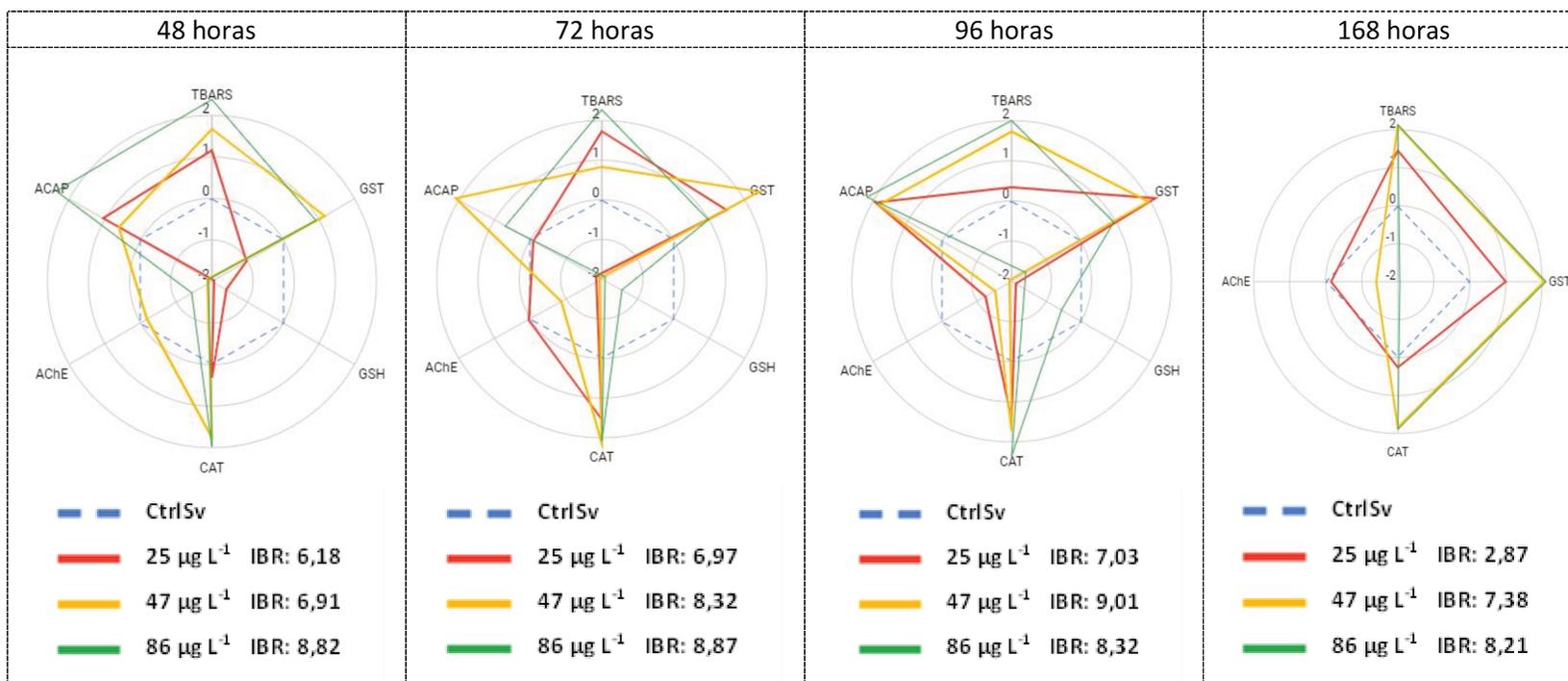
Figura 48. Análisis de componentes principales con marcadores bioquímicos, para los cuatro periodos de exposición a concentraciones subletales de TCS. A) 48 h, B) 72 h, C) 96 h y D) 168 h.

10.3.6 Análisis de IBRv2 según Sánchez et al. (2012)

En la Tabla 20 se muestran los gráficos de estrella junto con los valores de cada IBR. En este sentido, se observaron valores similares en todos los tiempos de exposición cuando los organismos estuvieron expuestos a la mayor concentración de TCS. En larvas expuestas durante 48, 72 y 168 h, se observó un aumento en los valores de IBRv2 dependiendo de la concentración de TCS, mientras que en organismos expuestos durante 96 h, el mayor valor de IBRv2 se observó a la concentración intermedia de TCS. El menor valor de IBR se registró para los organismos expuestos durante 168 h a la menor concentración de TCS.

Los biomarcadores que presentaron las mayores diferencias considerando todas las concentraciones de TCS luego de 48, 72 y 96 horas respecto al CtrlSv fueron: CAT, ACAP y GSH y TBARS. En peces expuestos durante 168 hpf, CAT y TBARS fueron los biomarcadores que mejor respondieron a las diferentes concentraciones de TCS.

Tabla 20. Gráficos de estrella y valores de IBRv2 para los diferentes tiempos de exposición a tres concentraciones de TCS en estadios tempranos del desarrollo de *D. rerio*.



10.4 Discusión

La susceptibilidad de las etapas tempranas del desarrollo de los peces al estrés causado por un contaminante puede afectar los procesos de diferenciación celular, provocando una cascada de defectos continuos en el desarrollo (Wiegand et al. 2000). El presente trabajo contribuye a entender las respuestas de diferentes biomarcadores en estadios tempranos del desarrollo de *D. rerio* expuestos a TCS. Las respuestas de los biomarcadores analizados mostraron que los embriones y larvas de *D. rerio* presentan niveles diferentes de actividad enzimática (AChE, GST), contenido de GSH y TBARS que varían en el tiempo, independientemente de la exposición a TCS. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Wiegand et al. (2000), que evidenciaron un aumento en las actividades de GST y GPx posterior a la eclosión de los embriones de *D. rerio*.

Los aumentos reportados en la concentración de GSH de larvas de 72 h y actividad GST en larvas de 168 h, podrían explicarse por el aumento en el metabolismo de los organismos, con un consecuente aumento de ROS durante la fosforilación oxidativa. Asimismo, el aumento en la actividad de la AChE en larvas de 72 h y 168 h podría deberse a la diferenciación de los tejidos y órganos, con la formación de músculo y complejización del sistema nervioso (Kimmel et al. 1995).

Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis propuesta por otros autores (Peters y Livingstone 1996; Wiegand et al. 1999; 2000) que sostienen que los peces en desarrollo acentúan después de la eclosión el conjunto de parámetros bioquímicos que los protegen contra el daño frente a xenobióticos.

Conocer las actividades de las enzimas y el contenido de biomarcadores de estrés oxidativo y neurotoxicidad en la ontogenia permite seleccionar etapas del desarrollo de

D. rerio para evaluar el efecto de los contaminantes como el TCS. En este sentido, es importante considerar la etapa del desarrollo estudiada y las posibles variaciones en las respuestas producto del crecimiento. Como resultado del aumento de la contaminación, es necesario que los organismos desintoxiquen adicionalmente varios compuestos para sobrevivir, pero la capacidad de estos sistemas protectores es limitada (Wiegand et al. 2000). Debido a situaciones de estrés interno durante el desarrollo temprano, por ejemplo, durante la eclosión o durante la adaptación al alimento vivo, los sistemas de desintoxicación podrían verse alterados, por lo que el estrés a un xenobiótico podría causar daños severos al individuo.

Las respuestas de los biomarcadores encontradas en la presente Tesis contribuyen a complementar la información previamente obtenida luego de la exposición a TCS reportada por diversos autores. En este contexto, la ausencia de alteraciones morfológicas y de cambios en ritmo cardíaco fue también observado por Macedo et al. (2017) y Ho et al. (2016) en larvas de 5 dpf luego de una exposición continua a un rango de concentraciones de TCS (10, 100, 250, 400, 800 y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Parenti et al. (2019) registraron un aumento en la actividad de GST en larvas de 96 y 120 h luego de una exposición a 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. El aumento en la actividad de GST del presente estudio fue observado a 96 h en la menor concentración y continuó en aumento luego de 168 h para las concentraciones más altas. Oliveira et al. (2009) observaron un aumento en la actividad de GST en larvas (96 hpf) luego de la exposición a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 350 $\mu\text{g L}^{-1}$ a TCS por 96 h. En este sentido, nuestros resultados indican que a lo largo del tiempo, y a concentraciones de TCS mayores y menores a las ensayadas en el presente estudio, la GST tiende a aumentar su actividad como respuesta a la exposición de TCS en larvas de *D. rerio*.

Por su parte el aumento en la actividad de la CAT fue observado en larvas de 96 hpf y 120 hpf de *D. rerio* luego de la exposición a TCS por 24 h y 120 h (Parenti et al. 2019). Si bien se probaron concentraciones menores de TCS, nuestros resultados permiten evidenciar una relación dosis-respuesta positiva, que se continúa con el tiempo de exposición.

Respecto a la actividad de AChE, Oliveira et al. (2009) registraron un aumento en la actividad en larvas de *D. rerio* (96 hpf) expuestas a $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, mientras que Araújo et al. (2019) no observaron diferencias en larvas de *S. senegalensis* luego de 3 días de exposición 30, 53, 95 y $169 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Por otro lado, Pullaguri et al. (2020) observaron la misma respuesta inhibitoria en la actividad de AChE y en la expresión génica en embriones de *D. rerio* (144 hpf) luego de la exposición a $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. Estos autores proponen que a concentraciones subletales, el TCS ocasiona daño neurotóxico en *D. rerio*. En el presente trabajo, la inhibición de AChE en larvas luego de 96 y 168 h expuestas a 47 y $86 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, confirma que a concentraciones menores de TCS, la inhibición de la enzima comienza en estadíos de embriones y continúa hasta luego de la eclosión de los mismos.

El aumento en los niveles de TBARS en organismos de 72, 96 y 168 h, luego de la exposición a $86 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, no ha sido reportado para otras exposiciones a TCS. Martins et al. (2019) no observaron aumentos en los niveles de TBARS a mayores concentraciones de TCS en larvas de *Pelophylax perezi* luego de 144 h de exposición. Asimismo, Araújo et al. (2019) no reportaron aumentos en los niveles de TBARS en larvas de *S. senegalensis* luego de 96 h de exposición a 30 y $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Nuestros resultados concuerdan para larvas de 96 h expuestas a 25 y $47 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS. La mayor

concentración de TCS ocasionó daño oxidativo en lípidos, por lo que la activación de las respuestas antioxidante (CAT y GST) no fueron suficientes para contrarrestarlo.

La disminución del contenido de GSH durante los 3 estadios evaluados luego de la exposición a TCS, evidencia una respuesta de tipo compensatoria de los organismos para contrarrestar las ROS. Luego de 96 h, la ausencia de diferencias en la concentración más alta de TCS concuerda con lo reportado por Falisse et al. (2017) quienes no registraron diferencias en el contenido de GSH luego de 7 días de exposición 50 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS en larvas de *D. rerio*. Los resultados permiten inferir que luego de un tiempo de exposición a TCS, los niveles de GSH se estabilizarían.

La disminución de ACAP observada en embriones de 48 h expuestos a 84 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS, indicaría una pérdida en la capacidad antioxidante antes del proceso de eclosión de los organismos. Luego de dicho periodo, los organismos serían capaces de equilibrar la generación de los radicales con su eliminación.

Los resultados de los biomarcadores por separado evidenciaron una pérdida en la capacidad antioxidante en estadios tempranos del desarrollo de *D. rerio* luego de la exposición a TCS. Sin embargo, con el objetivo de poder observar los cambios de manera integrada en los biomarcadores en esta tesis se han utilizado el índice IBR y ACP.

Numerosas investigaciones han utilizado el índice de IBR para observar sensibilidad en biomarcadores de estrés oxidativo (Dey et al. 2016; Vieira et al. 2016; Paul et al. 2020; Yang et al. 2021). Nuestros resultados sugieren que los organismos expuestos durante 96 h fueron los más sensibles frente a las dos concentraciones más bajas, mientras que todos los tiempos de exposición evidenciaron sensibilidad semejante luego de la exposición a 86 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TCS.

El ACP de 96 h fue el que mayor diferenció los controles de los 3 tratamientos con TCS, con CAT y AChE como los que mejor explican dicha separación. En este sentido, son los parámetros que deberían ser utilizados para monitorear la sensibilidad de las larvas de peces al TCS. En cuanto al ACP de organismos de 168 h, la concentración cercana a la ambiental ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) fue la que menos se alejó de los controles, demostrando que las larvas responden mejor a dicha concentración luego de un periodo mayor de exposición.

11. Conclusiones

Las evaluaciones ecotoxicológicas desarrolladas en la presente Tesis aportaron un mayor conocimiento de la toxicidad del TCS en una especie modelo como *D. rerio*. Se consideraron periodos cortos y prolongados de exposición y se evaluaron diferentes biomarcadores (comportamentales, bioquímicos, inmunológicos, de expresión génica, morfológicos y fisiológicos) luego de la exposición a concentraciones subletales de TCS en órganos claves. Asimismo, se contemplaron matrices ambientales relevantes para la evaluación de la disponibilidad del TCS. Finalmente, el presente trabajo abordó la toxicidad del TCS sobre los estadios del desarrollo más importantes de *D. rerio* (embriones, larvas, juveniles y adultos). Por lo expuesto y evaluado, se desprenden las siguientes conclusiones finales:

Capítulo I:

 El modelo experimental *ex vivo* de branquias proporcionó un medio de exposición útil y eficaz que permitió generar respuestas rápidas para así determinar el efecto tóxico promovido por el TCS aún en períodos cortos de exposición. Las alteraciones más significativas sobre los parámetros biomarcadores ocurrieron en branquias expuestas a $340 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS.

Capítulo II:

 Las alteraciones observadas en los diferentes biomarcadores evaluados reafirman y aportan nuevos datos sobre los cambios a nivel de estrés oxidativo y biotransformación promovidos por el TCS en diferentes tejidos de *D. rerio*, siendo las branquias y el hígado los órganos más sensibles a la exposición a corto plazo (2 días).

 La exposición aguda a dos concentraciones subletales de TCS permitió predecir los efectos que este PCP podría tener sobre los peces ante un escenario hipotético de contaminación ambiental promovido por el aporte de descargas puntuales de aguas no tratadas.

Capítulo III:

 La disminución en la frecuencia de linfocitos y el aumento de neutrófilos evidenciaría una tendencia a una menor capacidad para contrarrestar y/o reconocer agentes patógenos, como así también a una respuesta del tipo inflamatoria en los peces expuestos a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS durante 21 días.

 La exposición de los peces a concentraciones subletales de TCS durante 21 días promovió la disminución en el contenido de lípidos en hígado, evidenciando un costo energético para los organismos. Asimismo, si bien se activaron las respuestas antioxidantes mediadas por la CAT y la SOD en hígado de los peces expuestos, no fueron suficientes para evitar el daño oxidativo en lípidos.

 La exposición a una concentración ambientalmente relevante de TCS provocó la sobreexpresión génica en hígado de peces adultos, evidenciando respuestas a nivel transcripcional frente al estrés oxidativo (*nrf2* y *gst pi*) y de biotransformación de fase I (*cyp1a*). Por otro lado, la exposición a concentraciones mayores ($60 \mu\text{g L}^{-1}$) generó la subexpresión de los genes *gst pi* y *cyp1a* a nivel hepático.

 En branquias de los peces expuestos durante 21 días se demostró que la exposición prolongada a TCS produjo un desequilibrio homeostático oxidante-antioxidante mediado por respuestas insuficientes de la SOD y GST que no pudieron evitar el daño oxidativo en lípidos.

 Si bien las alteraciones sobre el equilibrio oxidante-antioxidante en cerebro de los peces expuestos a concentraciones subletales de TCS en agua durante 21 días no fueron evidentes, se verificó que en esas mismas condiciones el TCS ocasionó neurotoxicidad mediada por la inhibición de la actividad de AChE.

Capítulo IV:

 La batería de marcadores bioquímicos evaluados en *D. rerio* aportó una mayor comprensión sobre efectos tóxicos promovidos por la exposición a sedimentos contaminados con TCS. La caracterización de compuestos como TCS y MeTCS en las matrices de agua y sedimento, permitieron realizar inferencias directas sobre el contaminante y sus efectos en los peces.

 La actividad enzimática de la SOD, el daño oxidativo en lípidos y los niveles de ACAP fueron los biomarcadores más sensibles en órganos claves como hígado y branquias. El ensayo de exposición realizado con un organismo modelo no bentónico también destacó los efectos provocados por un sumidero importante del metabolito TCS (MeTCS).

Capítulo V:

 El método de integración de las respuestas bioquímicas propuesto por Sánchez et al. (2012) fue el que más información aportó respecto a la toxicidad del TCS en los ensayos con *D. rerio*. Asimismo, la estimación del índice es una herramienta de gran utilidad para evaluaciones de riesgo ambiental del TCS en peces expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes.

Capítulo VI:

 El sistema de ensayo de escape, preferencia y recolonización fue eficaz para determinar la respuesta sobre organismos juveniles de *D. rerio* expuestos a un

gradiente de contaminación con TCS. En este sentido, a partir de nuestros resultados, se evidenció que los peces fueron capaces de detectar y evitar ambientes contaminados, incluso ante concentraciones subletales.

 Los resultados obtenidos evidenciaron cómo el TCS puede actuar como perturbador ambiental condicionante de los procesos de selección de hábitat, impidiendo la recolonización y actuando como una barrera química que promueve la fragmentación de los mismos.

Capítulo VII:

 La exposición a concentraciones subletales de TCS promovió efectos neurotóxicos a través de la inhibición de AChE en estadios tempranos del desarrollo de *D. rerio* luego de 72, 96 y 168 h de exposición.

 No se observaron alteraciones morfológicas y fisiológicas en larvas y embriones de *D. rerio* luego de la exposición a concentraciones subletales de TCS.

 La exposición a $87 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCS promovió respuestas antioxidantes que en organismos expuestos por 72, 96 y 168 h no fueron suficientes para contrarrestar el daño oxidativo en lípidos.

 Los análisis integrados sobre los biomarcadores utilizados en estadios tempranos del desarrollo permitieron observar que las larvas expuestas durante 96 h a TCS fueron las más sensibles a la exposición de concentraciones subletales.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis generaron nuevos conocimientos acerca de los efectos del TCS sobre procesos biológicos claves en *D. rerio* en todos sus estadios de desarrollo. En este sentido, los procesos que se vieron alterados por la exposición a concentraciones subletales de TCS estuvieron relacionadas con el mantenimiento del

equilibrio homeostático oxidante-antioxidante y el impulso nervioso en organismos adultos y estadios tempranos del desarrollo. A nivel molecular, las concentraciones subletales alteraron la expresión de genes involucrados en procesos de biotransformación y estrés oxidativo. Asimismo, las respuestas sobre la capacidad de escape y recolonización de peces juveniles también se vieron modificados por la presencia del TCS. Por lo tanto, el presente trabajo permite concluir que la exposición a este xenobiótico afectó negativamente el estado de salud general de los organismos de *D. rerio* en sus diferentes etapas del desarrollo.

12. Bibliografía

- Abdel-Mageid, A. D., Zaki, A. G., El Senosi, Y. A., Fahmy, H. A., El Asely, A. M., Abo-Al-Ela, H. G., & El-Kassas, S. (2020). Modulatory effect of lipopolysaccharide on immune-related gene expression and serum protein fractionation in grey mullet, *Mugil cephalus*. *Aquaculture Research*, 51(4), 1643-1652.
- Adhikari, S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C. T., & Ayappan, S. (2004). Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(2), 220-226.
- Ale, A., Galdopórpóra, J. M., Desimone, M. F., de la Torre, F. R., & Cazenave, J. (2021). Nanosilver and silver nitrate toxicity in ex vivo-exposed gills of fish and mitigation by humic acids. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 107(3), 421-426.
- Ale, A., Rossi, A. S., Bacchetta, C., Gervasio, S., de la Torre, F. R., & Cazenave, J. (2018). Integrative assessment of silver nanoparticles toxicity in *Prochilodus lineatus* fish. *Ecological Indicators*, 93, 1190-1198.
- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., & Monserrat, J. M. (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*, 407(6), 2115-2123.
- American Public Health Association (APHA). (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, D.C., USA.
- Aragón, D. M., Ruidiaz, M. A., Vargas, E. F., Bregni, C., Chiappetta, D. A., Sosnik, A., & Martínez, F. (2008). Solubility of the antimicrobial agent triclosan in organic solvents of different hydrogen bonding capabilities at several temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 53(11), 2576-2580.
- Araújo, C. V., Griffith, D. M., Vera-Vera, V., Jentsch, P. V., Cervera, L., Nieto-Ariza, B., & Ribeiro, R. (2018a). A novel approach to assessing environmental disturbance based on habitat selection by zebrafish as a model organism. *Science of the Total Environment*, 619, 906-915.
- Araújo, C. V., Moreira-Santos, M., & Ribeiro, R. (2016). Active and passive spatial avoidance by aquatic organisms from environmental stressors: A complementary perspective and a critical review. *Environment International*, 92, 405-415.
- Araújo, C. V., Moreira-Santos, M., & Ribeiro, R. (2018b). Stressor-driven emigration and recolonisation patterns in disturbed habitats. *Science of the Total Environment*, 643, 884-889.
- Araújo, C. V., Shinn, C., Moreira-Santos, M., Lopes, I., Espíndola, E. L., & Ribeiro, R. (2014). Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 146, 70-75.

- Araújo, M. J., Quintaneiro, C., Soares, A. M. V. M., & Monteiro, M. S. (2019). Effects of triclosan on early development of *Solea senegalensis*: from biochemical to individual level. *Chemosphere*, 235, 885-899.
- Arnot, J. A., Pawlowski, S., & Champ, S. (2018). A weight-of-evidence approach for the bioaccumulation assessment of triclosan in aquatic species. *Science of the Total Environment*, 618, 1506-1518.
- Aswathy, P. K., Priyatha, C. V., Nikhil, J., & Chitra, K. C. (2021). Triclosan at environmental concentration alters the hepatic antioxidant defence system in the fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). *Aquaculture Research*, 52(12), 6641-6655.
- Ateş, P. S., Ünal, İ., Üstündağ, Ü. V., Alturfan, A. A., Yiğitbaşı, T., & Emekli-Alturfan, E. (2018). Methylparaben induces malformations and alterations on apoptosis, oxidant–antioxidant status, ccnd1 and myca expressions in zebrafish embryos. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(3), e22036.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., & Martins, R. N. (2012). Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *Journal of Visualized Experiments*, (69), e4196.
- Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M. J., & Cazenave, J. (2014). Combined toxicological effects of pesticides: a fish multi-biomarker approach. *Ecological Indicators*, 36, 532-538.
- Bagenal T. B., & Tesch F.W. (1978). Age and growth. In T. Bagenal (Ed), *Methods for assessment of fish production in freshwaters* (3rd ed., pp. 101-136). Blackwell Scientific Publications.
- Bagnyukova, T. V., Vasyukiv, O. Y., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2005). Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. *Brain Research*, 1052(2), 180-186.
- Balmer, M. E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P. A., Müller, M. D., & Buser, H. R. (2004). Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environmental Science and Technology*, 38(2), 390-395.
- Bao, S., He, C., Ku, P., Xie, M., Lin, J., Lu, S., & Nie, X. (2021). Effects of triclosan on the RedoximiRs/Sirtuin/Nrf2/ARE signaling pathway in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Aquatic Toxicology*, 230, 105679.
- Barreto, A., Luis, L. G., Paíga, P., Santos, L. H. M. L. M., Delerue-Matos, C., Soares, A. M. V. M., & Oliveira, M. (2018). A multibiomarker approach highlights effects induced by the human pharmaceutical gemfibrozil to gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquatic Toxicology*, 200, 266-274.
- Basu, N. (2015). Applications and implications of neurochemical biomarkers in environmental toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(1), 22-29.
- Baudou, F. G., Ossana, N. A., Castañé, P. M., Mastrángelo, M. M., Núñez, A. A. G., Palacio, M. J., & Ferrari, L. (2019). Use of integrated biomarker indexes for

- assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. *Science of the Total Environment*, 650, 1779-1786.
- Bedoux, G., Roig, B., Thomas, O., Dupont, V., & Bot, B. L. (2012). Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1044–1065.
 - Beliaeff, B. & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(6), 1316-1322.
 - Berhane, K., Widersten, M., Engström, Å., Kozarich, J. W., & Mannervik, B. (1994). Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(4), 1480-1484.
 - Bester, K. (2003). Triclosan in a sewage treatment process-balances and monitoring data. *Water Research*, 37(16), 3891-3896.
 - Beutler, E. (1982). Catalase. In Grune & Stratton (Ed), *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. University of Michigan.
 - Bi, R., Zeng, X., Mu, L., Hou, L., Liu, W., Li, P., & Xie, L. (2018). Sensitivities of seven algal species to triclosan, fluoxetine and their mixtures. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
 - Binelli, A., Parolini, M., Pedriali, A., & Provini, A. (2011). Antioxidant activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in response to triclosan exposure. *Water, Air and Soil Pollution*, 217, 421-430.
 - Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7(6), 1513-1523.
 - Boulanger, E., Barst, B. D., Alloy, M. M., Blais, S., Houde, M., & Head, J. A. (2019). Assessment of environmentally contaminated sediment using a contact assay with early life stage zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 659, 950-962.
 - Braunbeck, T., & Lammer, E. (2006). Fish embryo toxicity assays. In *German Federal Environment Agency*, 298, 7-119.
 - Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., & Seitz, N. (2005). Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. *Alternatives to Animal Experimentation*, 22(2), 87-102.
 - Burgos-Aceves, M. A., Abo-Al-Ela, H. G., & Faggio, C. (2021). Physiological and metabolic approach of plastic additive effects: Immune cells responses. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124114.
 - Burkina, V., Zlabek, V., & Zamaratskaia, G. (2015). Effects of pharmaceuticals present in aquatic environment on Phase I metabolism in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(2), 430-444.
 - Callard, G. V., Tchoudakova, A. V., Kishida, M., & Wood, E. (2001). Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and

- promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 79(1-5), 305-314.
- Canesi, L., Ciacci, C., Lorusso, L. C., Betti, M., Gallo, G., Pojana, G., & Marcomini, A. (2007). Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: possible modes of action on non target organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 145(3), 464-472.
 - Canosa, P., Morales, S., Rodriguez, I., Rubi, E., Cela, R., & Gomez, M. (2005). Aquatic degradation of triclosan and formation of toxic chlorophenols in presence of low concentrations of free chlorine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383(7), 1119-1126.
 - Capdevielle, M., Van Egmond, R., Whelan, M., Versteeg, D., Hofmann-Kamensky, M., Inauen, J., & Woltering, D. (2008). Consideration of exposure and species sensitivity of triclosan in the freshwater environment. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 4(1), 15-23.
 - Carriquiriborde, P. (2021). Biodisponibilidad, biotransformación, bioacumulación y biomagnificación de los contaminantes. En P. Carriquiriborde, (Coor). *Principios de Ecotoxicología*. (1ra edición). Edulp.
 - Cazenave, J., Amé, M. V., & Menone, M. L. (2021). Biomarcadores de Contaminación. En P. Carriquiriborde, (Coor). *Principios de Ecotoxicología* (pp. 116-125). Edulp.
 - Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., & Parma, M. J. (2014). Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study. *Ecological Indicators*, 38, 104-112.
 - Cazenave, J., de los Angeles Bistoni, M., Pesce, S. F., & Wunderlin, D. A. (2006). Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic Toxicology*, 76(1), 1-12.
 - Chai, L., Wang, H., Zhao, H., & Deng, H. (2016). Chronic effects of triclosan on embryonic development of Chinese toad, *Bufo gargarizans*. *Ecotoxicology*, 25, 1600-1608.
 - Chen, D., Zhang, J., & Chen, Y. P. (2021). Ecotoxicity assessment of a molybdenum mining effluent using acute lethal, oxidative stress, and osmoregulatory endpoints in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 5137-5148.
 - Chen, X., Nielsen, J. L., Furgal, K., Liu, Y., Lolas, I. B., & Bester, K. (2011). Biodegradation of triclosan and formation of methyl-triclosan in activated sludge under aerobic conditions. *Chemosphere*, 84(4), 452-456.
 - Chen, X., Pauly, U., Rehfus, S., & Bester, K. (2009). Removal of personal care compounds from sewage sludge in reed bed container (lysimeter) studies-effects of macrophytes. *Science of the Total Environment*, 407(21), 5743-5749.

- Cnubben, N. H., Rietjens, I. M., Wortelboer, H., van Zanden, J., & van Bladeren, P. J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *10*(4), 141-152.
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, *11*(3), 315-335.
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). (2005). Marco Ético de Referencia para las Investigaciones Biomédicas en Animales de laboratorio, de granja y obtenidos de la naturaleza. Buenos Aires, Argentina.
- Coogan, M. A., Edziyie, R. E., La Point, T. W., & Venables, B. J. (2007). Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere*, *67*(10), 1911-1918.
- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M., & Salbert, V. (2007). Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, *66*(3), 574-583.
- Dann, A. B., & Hontela, A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*, *31*, 285-311.
- Dar, O. I., Aslam, R., Pan, D., Sharma, S., Andotra, M., Kaur, A., & Faggio, C. (2022). Source, bioaccumulation, degradability and toxicity of triclosan in aquatic environments: A review. *Environmental Technology and Innovation*, *25*, 102-122.
- Davis, E. F., Klosterhaus, S. L., & Stapleton, H. M. (2012). Measurement of flame retardants and triclosan in municipal sewage sludge and biosolids. *Environment International*, *40*, 1-7.
- Dawood, M. A., Noreldin, A. E., & Sewilam, H. (2021). Long term salinity disrupts the hepatic function, intestinal health, and gills antioxidative status in Nile tilapia stressed with hypoxia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *220*, 112412.
- De la Torre, R., Ferrari, L., & 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.
- DeLorenzo, M. E., & Fleming, J. (2008). Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *54*(2), 203-210.
- DeLorenzo, M.E., Keller, J.M., Arthur, C.D., Finnegan, M.C., Harper, H.E., Winder, V.L., & Zdankiewicz, D.L. (2008). Toxicity of the antimicrobial compound triclosan and formation of the metabolite methyl-triclosan in estuarine systems. *Environmental Toxicology: An International Journal*, *23*(2), 224-232.
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., & Pain-Devin, S. (2014). The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*, 2448-2454.

- Dey, S., Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., Kole, D., & Ghosh, A. R. (2016). Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide. *Emerging Contaminants*, 2(4), 191-203.
- Di Giulio, R. T., & Hinton, D. E. (Eds). (2008). *The toxicology of fishes*. CRC Press.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., & Robledo, C. W. (2012). InfoStat v. 2012. Available in: <http://www.infostat.com.ar>.
- Dussault, È. B., Balakrishnan, V. K., Sverko, E. D., Solomon, K. R., & Sibley, P. K. (2008). Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(2), 425-432.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P., & Ronco, A. E. (2013). Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90, 397-400.
- Fainstein, M. K. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(1), 18-25.
- Fair, P. A., Lee, H. B., Adams, J., Darling, C., Pancepavicius, G., Alae, M., & Muir, D. (2009). Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment. *Environmental Pollution*, 157(8-9), 2248-2254.
- Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Horyn, O., & Stoliar, O. B. (2017). Vulnerability of marsh frog *Pelophylax ridibundus* to the typical wastewater effluents ibuprofen, triclosan and estrone, detected by multi-biomarker approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 202, 26-38.
- Falisse, E., Voisin, A. S., & Silvestre, F. (2017). Impacts of triclosan exposure on zebrafish early-life stage: Toxicity and acclimation mechanisms. *Aquatic Toxicology*, 189, 97-107.
- Fantón, N., Cazenave, J., Michlig, M. P., Repetti, M. R., & Rossi, A. (2021). Biomarkers of exposure and effect in the armoured catfish *Hoplosternum littorale* during a rice production cycle. *Environmental Pollution*, 287, 117356.
- Farombi, E. O., Ajimoko, Y. R., & Adelowo, O. A. (2008). Effect of butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water African catfish (*Clarias gariepinus*). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 5(5), 423-427.
- Farré, M., Asperger, D., Kantiani, L., González, S., Petrovic, M., & Barceló, D. (2008). Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 1999-2007.

- Felício, A. A., Freitas, J. S., Scarin, J. B., de Souza Ondeí, L., Teresa, F. B., Schlenk, D., & de Almeida, E. A. (2018). Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 248-256.
- Fent, K., Kunz, P. Y., Zenker, A., & Rapp, M. (2010). A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Marine Environmental Research*, 69, S4-S6.
- Fiss, E. M., Rule, K. L., & Vikesland, P. J. (2007). Formation of chloroform and other chlorinated byproducts by chlorination of triclosan-containing antibacterial products. *Environmental Science and Technology*, 41(7), 2387-2394.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Foran, C. M., Bennett, E. R., & Benson, W. H. (2000). Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Marine Environmental Research*, 50(1-5), 153-156.
- Fu, J., Gong, Z., & Kelly, B. C. (2019). Metabolomic profiling of zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to the antibacterial agent triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(1), 240-249.
- Fu, J., Tan, Y. X. R., Gong, Z., & Bae, S. (2020). The toxic effect of triclosan and methyl-triclosan on biological pathways revealed by metabolomics and gene expression in zebrafish embryos. *Ecotoxicology and environmental safety*, 189, 110039.
- Fu, J., & Bae, S. (2020). The pH-dependent toxicity of triclosan on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos using metabolomics. *Aquatic Toxicology*, 226, 105560.
- Fuller, M. R., Doyle, M. W., & Strayer, D. L. (2015). Causes and consequences of habitat fragmentation in river networks. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1355(1), 31-51.
- Gandar, A., Laffaille, P., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Perrault, A., & Jean, S. (2017). Adaptive response under multiple stress exposure in fish: from the molecular to individual level. *Chemosphere*, 188, 60-72.
- Gaume, B., Bourgougnon, N., Auzoux-Bordenave, S., Roig, B., Le Bot, B., & Bedoux, G. (2012). In vitro effects of triclosan and methyl-triclosan on the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 156(2), 87-94.
- Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción+ Limpia*, 7(2), 52-73.

- Giuliani, M. E., Benedetti, M., Arukwe, A., & Regoli, F. (2013). Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. *Aquatic Toxicology*, *134*, 120-127.
- Giusto, A., Salibián, A., & Ferrari, L. (2014). Biomonitoring toxicity of natural sediments using juvenile *Hyalella curvispina* (Amphipoda) as test species: evaluation of early effect endpoints. *Ecotoxicology*, *23*, 293-303.
- Giusto, A., Somma, L. A., & Ferrari, L. (2012). Cadmium toxicity assessment in juveniles of the Austral South America amphipod *Hyalella curvispina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *79*, 163-169.
- Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., & Smital, T. (2015). Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, *158*, 50-62.
- Goede, R. W., & Barton, B. A. (1990). Biological indicators of stress in fish. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *American Fisheries Society Symposium*, *8*, 93-108.
- Gomes, M. F., de Paula, V. D. C. S., Martins, L. R. R., Garcia, J. R. E., Yamamoto, F. Y., & de Freitas, A. M. (2021). Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (*Rhamdia quelen*) embryos. *Chemosphere*, *263*, 127985.
- Gomez Escalada, M., Russell, A. D., Maillard, J. Y., & Ochs, D. (2005). Triclosan–bacteria interactions: single or multiple target sites?. *Letters in Applied Microbiology*, *41*(6), 476-481.
- Green, J., & Wheeler, J. R. (2013). The use of carrier solvents in regulatory aquatic toxicology testing: Practical, statistical and regulatory considerations. *Aquatic Toxicology*, *144*, 242-249.
- Gu, Z., Jia, R., He, Q., Cao, L., Du, J., Feng, W., & Yin, G. (2021). Alteration of lipid metabolism, autophagy, apoptosis and immune response in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*) after long-term exposure to bisphenol A. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *211*, 111923.
- Gyimah, E., Dong, X., Qiu, W., Zhang, Z., & Xu, H. (2020). Sublethal concentrations of triclosan elicited oxidative stress, DNA damage, and histological alterations in the liver and brain of adult zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*, 17329-17338.
- Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1981). Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In *Methods in enzymology*, *77*, 398-405. Academic Press.
- Haggard, D. E., Noyes, P. D., Waters, K. M., & Tanguay, R. L. (2016). Phenotypically anchored transcriptome profiling of developmental exposure to the antimicrobial agent, triclosan, reveals hepatotoxicity in embryonic zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *308*, 32-45.
- Hahn, M. E., Timme-Laragy, A. R., Karchner, S. I., & Stegeman, J. J. (2015). Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity: Insights

- from studies in zebrafish (*Danio rerio*). *Free Radical Biology and Medicine*, *88*, 275-289.
- Halden, R. U., & Paull, D. H. (2005). Co-occurrence of triclocarban and triclosan in US water resources. *Environmental Science and Technology*, *39*(6), 1420-1426.
 - Hallare, A. V., Seiler, T. B., & Hollert, H. (2011). The versatile, changing, and advancing roles of fish in sediment toxicity assessment: a review. *Journal of Soils and Sediments*, *11*, 141-173.
 - Han, E. H., Kim, H. G., Hwang, Y. P., Choi, J. H., Im, J. H., Park, B., & Jeong, H. G. (2010). The role of cyclooxygenase-2-dependent signaling via cyclic AMP response element activation on aromatase up-regulation by o, p'-DDT in human breast cancer cells. *Toxicology Letters*, *198*(3) 331-341.
 - Hay, A. G., Dees, P. M., & Saylor, G. S. (2001). Growth of a bacterial consortium on triclosan. *Microbiology Ecology*, *36*(3), 105-112.
 - Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *30*(6), 445-520.
 - Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *45*, 51-88.
 - Heath, R. J., Rubin, J. R., Holland, D. R., Zhang, E., Snow, M. E., & Rock, C. O. (1999). Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(16), 11110-11114.
 - Hemalatha, D., Nataraj, B., Rangasamy, B., Shobana, C., & Ramesh, M. (2019). DNA damage and physiological responses in an Indian major carp *Labeo rohita* exposed to an antimicrobial agent triclosan. *Fish Physiology and Biochemistry*, *45*, 1463-1484.
 - Ho, J. C., Hsiao, C. D., Kawakami, K., & William, K. F. (2016). Triclosan (TCS) exposure impairs lipid metabolism in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, *173*, 29-35.
 - Ho, K. T., Chariton, A. A., Portis, L. M., Proestou, D., Cantwell, M. G., Baguley, J. G., & Kamikawa, A. (2013). Use of a novel sediment exposure to determine the effects of triclosan on estuarine benthic communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(2), 384-392.
 - Hontela, A., & Habibi, H. R. (2013). Personal care products in the aquatic environment: a case study on the effects of triclosan in fish. In K. B. Tierney, A. P. Farrell, & C. J. Brauner (Eds), *Fish Physiology* (pp. 411-437). Academic Press.
 - Huang, W., Ai, W., Lin, W., Fang, F., Wang, X., Huang, H., & Wang, H. (2020). Identification of receptors for eight endocrine disrupting chemicals and their underlying mechanisms using zebrafish as a model organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *204*, 111068.
 - Huang, X., Wu, C., Hu, H., Yu, Y., & Liu, J. (2015). Sorption and degradation of triclosan in sediments and its effect on microbes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *116*, 76-83.

- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., & Arizono, K. (2004). Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic toxicology*, 67(2), 167-179.
- Islam, M. A., Blasco, J., & Araújo, C. V. (2019). Spatial avoidance, inhibition of recolonization and population isolation in zebrafish (*Danio rerio*) caused by copper exposure under a non-forced approach. *Science of the Total Environment*, 653, 504-511.
- International Organization for Standardization (ISO). (1996). Determination of the acute lethal toxicity of substances to freshwater fish (*Brachydanio rerio*, Hamilton Buchanan, Teleostei, Cyprinidae, part 1 to 3), (ISO Standard N° 7346:1996).
- International Organization for Standardization (ISO). (2007) *Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Danio rerio)*, (ISO Standard N° 15088:2017).
- Iturburu, F. G., Bertrand, L., Mendieta, J. R., Amé, M. V., & Menone, M. L. (2018). An integrated biomarker response study explains more than the sum of the parts: oxidative stress in the fish *Australoheros facetus* exposed to imidacloprid. *Ecological Indicators*, 93, 351-357.
- Jacobs, M. N., Nolan, G. T., & Hood, S. R. (2005). Lignans, bacteriocides and organochlorine compounds activate the human pregnane X receptor (PXR). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209(2), 123-133.
- Ji, K., Hong, S., Kho, Y., & Choi, K. (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental Science and Technology*, 47(15), 8793-8800.
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., & Fu, Z. (2010). Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78(7), 846-852.
- Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(9-10), 1865-1879.
- Kammann, U., Vobach, M., & Wosniok, W. (2006). Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51, 97-102.
- Kazeto, Y., Place, A. R., & Trant, J. M. (2004). Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology*, 69(1), 25-34.
- Ketterer, B., & Christodoulides, L. G. (1994). Enzymology of cytosolic glutathione S-transferases. *Advances in Pharmacology*, 27, 37-69.
- Khatikarn, J., Satapornvanit, K., Price, O. R., & Van den Brink, P. J. (2018). Effects of triclosan on aquatic invertebrates in tropics and the influence of pH on its toxicity on microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 13244-13253.

- Kim, J., Oh, H., Ryu, B., Kim, U., Lee, J. M., Jung, C. R., & Park, J. H. (2018). Triclosan affects axon formation in the neural development stages of zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, *236*, 304-312.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, *203*(3), 253-310.
- Kishida, M., & Callard, G. V. (2001). Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*, *142*(2), 740-750.
- Kishida, M., McLellan, M., Miranda, J. A., & Callard, G. V. (2001). Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *129*(2-3), 261-268.
- Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*, *7*(3-4), 385-394.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, *30*(6), 620-650.
- Ku, P., Wu, X., Nie, X., Ou, R., Wang, L., Su, T., & Li, Y. (2014). Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, *166*, 105-114.
- Kumar, K. S., Priya, S. M., Peck, A. M., & Sajwan, K. S. (2010). Mass loadings of triclosan and triclocarbon from four wastewater treatment plants to three rivers and landfill in Savannah, Georgia, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *58*, 275-285.
- Kumar, S., Paul, T., Shukla, S. P., Kumar, K., Karmakar, S., & Bera, K. K. (2021). Biomarkers-based assessment of triclosan toxicity in aquatic environment: A mechanistic review. *Environmental Pollution*, *286*, 117569.
- Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., & Braunbeck, T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, *149*(2), 196-209.
- Lee, H. R., Hwang, K. A., Nam, K. H., Kim, H. C., & Choi, K. C. (2014). Progression of breast cancer cells was enhanced by endocrine-disrupting chemicals, triclosan and octylphenol, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway in cellular and mouse xenograft models. *Chemical Research in Toxicology*, *27*(5), 834-842.

- Legendre, L., & Legendre, P. (1979). Ecologie numérique. 2-la structure des données écologiques. In: Masson (Ed), *L'ordination en espace réduit*, (101–146). Les Presses de l'Université du Québec.
- Li, C., Qu, R., Chen, J., Zhang, S., Allam, A. A., Ajarem, J., & Wang, Z. (2018). The pH-dependent toxicity of triclosan to five aquatic organisms (*Daphnia magna*, *Photobacterium phosphoreum*, *Danio rerio*, *Limnodrilus hoffmeisteri*, and *Carassius auratus*). *Environmental Science and Pollution Research*, *25*, 9636–9646.
- Li, X., Ma, J., Fang, Q., & Li, Y. (2013). Transcription alterations of microRNAs, cytochrome P4501A1 and 3A65, and AhR and PXR in the liver of zebrafish exposed to crude microcystins. *Toxicol*, *73*, 17–22.
- Li, W., Wang, S., Li, J., Wang, X., Cui, L., Chen, J., & Liu, Z. (2020). Antioxidative enzyme activities in the *Rhodeinae sinensis* Gunther and *Macrobrachium nipponense* and multi-endpoint assessment under tonalide exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *199*, 110751.
- Liang, X., Nie, X., Ying, G., An, T., & Li, K. (2013). Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by a multi-biomarker approach. *Chemosphere*, *90*(3), 1281–1288.
- Lindström, A., Buerge, I. J., Poiger, T., Bergqvist, P. A., Müller, M. D., & Buser, H. R. (2002). Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environmental Science and Technology*, *36*(11), 2322–2329.
- Liu, J. L., & Wong, M. H. (2013). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. *Environment International*, *59*, 208–224.
- Liu, J., Sun, L., Zhang, H., Shi, M., Dahlgren, R. A., Wang, X., & Wang, H. (2018). Response mechanisms to joint exposure of triclosan and its chlorinated derivatives on zebrafish (*Danio rerio*) behavior. *Chemosphere*, *193*, 820–832.
- Liu, M., Ai, W., Sun, L., Fang, F., Wang, X., Chen, S., & Wang, H. (2019). Triclosan-induced liver injury in zebrafish (*Danio rerio*) via regulating MAPK/p53 signaling pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, *222*, 108–117.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, *25*(4), 402–408.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265–275.
- Lozano, I. E., Piazza, Y. G., Babay, P., Sager, E., de la Torre, F. R., & Nostro, F. L. L. (2021). Ivermectin: A multilevel approach to evaluate effects in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae), an inland fishery species. *Science of The Total Environment*, *800*, 149515.

- Lu, Y., & Gao, X. (2009). Multiple mechanisms responsible for differential susceptibilities of *Sitobion avenae* (Fabricius) and *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) to pirimicarb. *Bulletin of Entomological Research*, 99(6), 611-617.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30.
- Lushchak, V. I. (2015). Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 711-747.
- Lyndall J, Fuchsman P, Bock M, Barber T, Lauren D, Leigh K, Perruchon E, & Capdevielle, M. (2010). Probabilistic risk evaluation for triclosan in surface water, sediments, and aquatic biota tissues. *Integrated Environmental Assess Manage*, 6, 419–440.
- Ma, Y., Zang, L., Wang, D., Jiang, J., Wang, C., Wang, X., & Wang, H. (2019a). Effects of miR-181a-5p abnormal expression on zebrafish (*Danio rerio*) vascular development following triclosan exposure. *Chemosphere*, 223, 523-535.
- Ma, Z., Liu, H., & Yu, H. (2019). Triclosan affects Ca²⁺ regulatory module and musculature development in skeletal myocyte during early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology*, 53(20), 11988-11998.
- MacLoughlin, T. M., Peluso, L., & Marino, D. J. (2017). Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Science of the Total Environment*, 598, 572-580.
- Macedo, S., Torres, T., & Santos, M. M. (2017). Methyl-triclosan and triclosan impact embryonic development of *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus*. *Ecotoxicology*, 26, 482-489.
- Mahalak, K. K., Firman, J., Lee, J. J., Bittinger, K., Nuñez, A., Mattei, L. M., & Liu, L. S. (2020). Triclosan has a robust, yet reversible impact on human gut microbial composition *in vitro*. *Plos one*, 15(6), e0234046.
- Martin, L. B., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2008). Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1490), 321-339.
- Martinez, M., & Peñuela, G. A. (2013). Analysis of triclosan and 4n-nonylphenol in Colombian reservoir water by gas chromatography-mass spectrometry. *Water and Environment Journal*, 27(3), 387-395.
- Martins, D., Monteiro, M. S., Soares, A. M., & Quintaneiro, C. (2017). Effects of 4-MBC and triclosan in embryos of the frog *Pelophylax perezii*. *Chemosphere*, 178, 325-332.
- McAvoy, D. C., Schatowitz, B., Jacob, M., Hauk, A., & Eckhoff, W. S. (2002). Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(7), 1323-1329.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244 (22), 6049-6055.

- McMurry L.M., Oethinger M., & Levy S.B. (1998). Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*, 394(6693), 531–532.
- Miei-ro, C. L., Martins, M., da Silva, M., Coelho, J. P., Lopes, C. B., da Silva, A. A., & Pacheco, M. (2019). Advances on assessing nanotoxicity in marine fish—the pros and cons of combining an ex vivo approach and histopathological analysis in gills. *Aquatic Toxicology*, 217, 105322.
- Monserrat, J. M. (2021). Estrés oxidativo. En P. Carriquiriborde, (Coor), *Principios de Ecotoxicología* (pp. 116-125). Edulp.
- Monserrat, J. M., Garcia, M. L., Ventura-Lima, J., Gonzalez, M., Ballesteros, M. L., Miglioranza, K. S. B., & Wunderlin, D. A. (2014). Antioxidant, phase II and III responses induced by lipoic acid in the fish *Jenynsia multidentata* (Anablipidae) and its influence on endosulfan accumulation and toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 108, 8-15.
- Montes-Grajales, D., Fennix-Agudelo, M., & Miranda-Castro, W. (2017). Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *Science of the Total Environment*, 595, 601-614.
- Moreira-Santos, M., Donato, C., Lopes, I., & Ribeiro, R. (2008). Avoidance tests with small fish: Determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed-effect gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(7), 1576-1582.
- Nassef, M., Matsumoto, S., Seki, M., Kang, I. J., Moroishi, J., Shimasaki, Y., & Oshima, Y. (2009). Pharmaceuticals and personal care products toxicity to Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 54(2), 407–411.
- Nebert, D. W. & Karp, C. L. (2008). Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR): intersection of cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized eicosanoids and AHR biology. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36061-36065.
- Ni, H., Peng, L., Gao, X., Ji, H., Ma, J., Li, Y., & Jiang, S. (2019). Effects of maduramicin on adult zebrafish (*Danio rerio*): Acute toxicity, tissue damage and oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 249-259.
- Nilsen, M. B., Berg, K., & Goksoør, A. (1998). Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish a biomarker for environmental pollution. *Cytochrome P450 Protocols*, 423-438.
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Oakes, K. D., & Van Der Kraak, G. J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63(4), 447-463.
- O'Donovan, S., Mestre, N. C., Abel, S., Fonseca, T. G., Carteny, C. C., Willems, T., & Bebianno, M. J. (2020). Effects of the UV filter, oxybenzone, adsorbed to

- microplastics in the clam *Scrobicularia plana*. *Science of the Total Environment*, 733, 139102.
- Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). (1992). *Guideline for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems. Test Guideline 203: Fish, Acute toxicity test*. Paris.
 - Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). (1998). *Guideline for the testing of chemicals. Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages 212*. Paris.
 - Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). (2006). *Guideline for the testing of chemicals. Fish embryo toxicity test*. Paris.
 - Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). (2008). *Guideline for the testing of chemicals. Fish Screening Assay for Endocrine Active Substances*. Paris.
 - Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). (2009). *Guideline for the testing of chemicals. 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition. Nº 230*. Paris.
 - Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). (2013). *Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test Nº 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. Paris.
 - Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
 - Oliveira, R. (2009) O peixe-zebra como uma ferramenta para avaliação de ecotoxicidade (Zebrafish early life-stages and adults as a tool for ecotoxicity assessment). [Tese Doutoral Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia].
 - Oliveira, R., Domingues, I., Koppe Grisolia, C., & Soares, A. M. (2009). Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(6), 679-688.
 - Oruc, E. O., Sevgiler, Y., & Uner, N. (2004). Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2, 4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 137(1), 43-51.
 - Orvos, D. R., Versteeg, D. J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., & Cunningham, V. (2002). Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(7), 1338-1349.
 - Padilla, S. (2014). Biomarkers of toxicity in zebrafish. In R. C. Gupta (Ed). *Biomarkers in Toxicology* (pp. 103-112). Academic Press.
 - Pal, A., Gin, K. Y. H., Lin, A. Y. C., & Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment*, 408(24), 6062-6069.
 - Palenske, N. M., Nallani, G. C., & Dzialowski, E. M. (2010). Physiological effects and bioconcentration of triclosan on amphibian larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 152(2), 232-240.

- Pan, C. G., Peng, F. J., Shi, W. J., Hu, L. X., Wei, X. D., & Ying, G. G. (2018). Triclosan-induced transcriptional and biochemical alterations in the freshwater green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *148*, 393-401.
- Parenti, C. C., Ghilardi, A., Della Torre, C., Mandelli, M., Magni, S., Del Giacco, L., & Binelli, A. (2019). Environmental concentrations of triclosan activate cellular defence mechanism and generate cytotoxicity on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science of the Total Environment*, *650*, 1752-1758.
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., & Engeszer, R. E. (2009). Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*, *238*(12), 2975-3015.
- Paul, T., Kumar, S., Shukla, S. P., Pal, P., Kumar, K., Poojary, N., & Mishra, A. (2020). A multi-biomarker approach using integrated biomarker response to assess the effect of pH on triclosan toxicity in *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878). *Environmental Pollution*, *260*, 114001.
- Paul, T., Shukla, S. P., Kumar, K., Poojary, N., & Kumar, S. (2019). Effect of temperature on triclosan toxicity in *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878): Hematology, biochemistry and genotoxicity evaluation. *Science of the Total Environment*, *668*, 104-114.
- Peakall, D.W. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News* *1*, 55-60.
- Peng, F. J., Ying, G. G., Pan, C. G., Selck, H., Salvito, D., & Van den Brink, P. J. (2018). Bioaccumulation and biotransformation of triclosan and galaxolide in the freshwater oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* in a water/sediment microcosm. *Environmental Science and Technology*, *52*(15), 8390-8398.
- Perron, M. M., Ho, K. T., Cantwell, M. G., Burgess, R. M., & Pelletier, M. C. (2012). Effects of triclosan on marine benthic and epibenthic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *31*(8), 1861-1866.
- Peters, L. D., & Livingstone, D. R. (1996). Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot. *Journal of Fish Biology*, *49*(5), 986-997.
- Petitjean, Q., Jean, S., Gandar, A., Côte, J., Laffaille, P., & Jacquin, L. (2019). Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Science of the Total Environment*, *684*, 371-380.
- Pullaguri, N., Nema, S., Bhargava, Y., & Bhargava, A. (2020). Triclosan alters adult zebrafish behavior and targets acetylcholinesterase activity and expression. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *75*, 103311.
- Pusceddu, F. H., Choueri, R. B., Pereira, C. D. S., Cortez, F. S., Santos, D. R. A. D., Moreno, B. B., & Cesar, A. (2018). Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints. *Environmental Pollution*, *232*, 274-283.

- Qiu, W., Chen, J., Li, Y., Chen, Z., Jiang, L., Yang, M., & Wu, M. (2016). Oxidative stress and immune disturbance after long-term exposure to bisphenol A in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 93-102.
- Rand, G. M. (Ed.). (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. CRC press.
- Raut, S. A., & Angus, R. A. (2010). Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), 1287-1291.
- Reed, B., & Jennings, M. (2011). Guidance on the housing and care of zebrafish danio rerio. *Guidance on the housing and care of zebrafish Danio rerio*.
- Regoli, F., Benedetti, M., & Giuliani, M. E. (2011). Antioxidant defenses and acquisition of tolerance to chemical stress. *Tolerance to Environmental Contaminants*, 1, 153-173.
- Regoli, F., & Winston, G. W. (1998). Applications of a new method for measuring the total oxyradical scavenging capacity in marine invertebrates. *Marine Environmental Research*, 46(1-5), 439-442.
- Reichert, G., Hilgert, S., Fuchs, S., & Azevedo, J. C. R. (2019). Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. *Environmental Pollution*, 255, 113140.
- Reiss, R., Mackay, N., Habig, C., & Griffin, J. (2002). An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(11), 2483-2492.
- Ribeiro, S., Torres, T., Martins, R., & Santos, M. M. (2015). Toxicity screening of diclofenac, propranolol, sertraline and simvastatin using *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus* embryo bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 67-74.
- Rodricks J.V., Swenberg J.A., Borzelleca J.F., Maronpot R.R., & Shipp A.M. (2010). Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(5), 422-484.
- Roh, H., Subramanya, N., Zhao, F., Yu, C. P., Sandt, J., & Chu, K. H. (2009). Biodegradation potential of wastewater micropollutants by ammonia-oxidizing bacteria. *Chemosphere*, 77(8), 1084-1089.
- Rojo, M. G. (2021). *Estudio de la acumulación de compuestos farmacéuticos de uso humano en especies de peces de la Cuenca del Plata*. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata].
- Ronco, A., Peluso, L., Jurado, M., Bulus Rossini, G., & Salibian, A. (2008). Screening of sediment pollution in tributaries from the southwestern coast of the Río de la Plata estuary. *Latin American Journal of Sedimentology and Basin Analysis*, 15(1), 67-75.

- Rossi, A., Bacchetta, C., & Cazenave, J. (2017). Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). *Ecological Indicators*, 79, 361-370.
- Ruskiewicz, J. A., Li, S., Rodriguez, M. B., & Aschner, M. (2017). Is Triclosan a neurotoxic agent? *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 20(2), 104-117.
- Sager, E., Scarcia, P., Marino, D., Mac Loughlin, T., Rossi, A., & de La Torre, F. (2022). Oxidative stress responses after exposure to triclosan sublethal concentrations: an integrated biomarker approach with a native (*Corydoras paleatus*) and a model fish species (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 85(7), 291-306.
- Sahu, V. K., Karmakar, S., Kumar, S., Shukla, S. P., & Kumar, K. (2018). Triclosan toxicity alters behavioral and hematological parameters and vital antioxidant and neurological enzymes in *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878). *Aquatic Toxicology*, 202, 145-152.
- Sakuma, M. (1998). Probit analysis of preference data. *Applied Entomology and Zoology*, 33(3), 339-347.
- Saley, A., Hess, M., Miller, K., Howard, D., & King-Heiden, T. C. (2016). Cardiac toxicity of triclosan in developing zebrafish. *Zebrafish*, 13(5), 399-404.
- Sanchez, W., Burgeot, T., & Porcher, J. M. (2012). A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 2721-2725.
- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditche, J. M., & Porcher, J. M. (2008). Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environment International*, 34(4), 490-498.
- Sanchez-Hernandez, J. C., Sandoval, M., & Pierart, A. (2017). Short-term response of soil enzyme activities in a chlorpyrifos-treated mesocosm: use of enzyme-based indexes. *Ecological Indicators*, 73, 525-535.
- Sanchez-Prado, L., Barro, R., Garcia-Jares, C., Llompert, M., Lores, M., Petrakis, C., & Psillakis, E. (2008). Sonochemical degradation of triclosan in water and wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5), 689-694.
- Sancho, E., Villarroel, M. J., Fernández, C., Andreu, E., & Ferrando, M. D. (2010). Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 370-376.
- Sandborgh-Englund, G., Adolfsson-Erici, M., Odham, G., & Ekstrand, J. (2006). Pharmacokinetics of triclosan following oral ingestion in humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 69(20), 1861-1873.
- Santillán Deiú, A., Miglioranza, K. S., Ondarza, P. M., & de la Torre, F. R. (2021). Exposure to environmental concentrations of fipronil induces biochemical changes on a neotropical freshwater fish. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 43872-43884.

- Sawyer, S. J., Gerstner, K. A., & Callard, G. V. (2006). Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147(2), 108-117.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., & Raisuddin, S. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(2), 295-301.
- Scarcia, Paola. (2013). *Biomarcadores de contaminación de teleósteos dulceacuícolas como herramienta de evaluación de ambientes acuáticos afectados por compuestos orgánicos persistentes*. [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales].
- Scarcia, P., Calamante, G., & de la Torre, F. (2014). Responses of biomarkers of a standardized (*Cyprinus carpio*) and a native (*Pimelodella laticeps*) fish species after in situ exposure in a periurban zone of Luján river (Argentina). *Environmental Toxicology*, 29(5), 545-557.
- SCCS - Scientific committee on consumer safety. 2010. Opinion on triclosan (antimicrobial resistance). ISSN 1831-4767.
- Schultz, M. M., Bartell, S. E., & Schoenfuss, H. L. (2012). Effects of triclosan and triclocarban, two ubiquitous environmental contaminants, on anatomy, physiology, and behavior of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63, 114-124.
- Shao, B., Zhu, L., Dong, M., Wang, J., Wang, J., Xie, H., & Zhu, S. (2012). DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology*, 21, 1533-1540.
- Sheng, C., Zhang, S., & Zhang, Y. (2021). The influence of different polymer types of microplastics on adsorption, accumulation, and toxicity of triclosan in zebrafish. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123733.
- Siccardi III, A. J., Garris, H. W., Jones, W. T., Moseley, D. B., D'Abramo, L. R., & Watts, S. A. (2009). Growth and survival of zebrafish (*Danio rerio*) fed different commercial and laboratory diets. *Zebrafish*, 6(3), 275-280.
- Silva, D. C., Araújo, C. V., França, F. M., Neto, M. B., Paiva, T. C., Silva, F. T., & Pompêo, M. L. (2018). Bisphenol risk in fish exposed to a contamination gradient: Triggering of spatial avoidance. *Aquatic Toxicology*, 197, 1-6.
- Silva, D. C., Araújo, C. V., López-Doval, J. C., Neto, M. B., Silva, F. T., Paiva, T. C., & Pompêo, M. L. (2017). Potential effects of triclosan on spatial displacement and local population decline of the fish *Poecilia reticulata* using a non-forced system. *Chemosphere*, 184, 329-336.
- Singer, H., Müller, S., Tixier, C., & Pillonel, L. (2002). Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environmental Science and Technology*, 36(23), 4998-5004.

- Singh, S., Khanna, V. K., & Pant, A. B. (2018). Development of in vitro toxicology: a historic story. In A. Dhawan, & S. Kwon (Eds), *In Vitro Toxicology* (pp. 1-19). Academic Press.
- Slooff, W., Van Kreijl, C. F., & Baars, A. J. (1983). Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*, 4(1), 1-14.
- Soares Guidony Pereira, N., Marques de Souza, M., & Pyle, G.G. (2022, marzo). *Can Triclosan Exposure Alters Chemosensory Function and Behaviour in Adult Zebrafish?* [Poster session]. 14th Congreso de SETAC Latin America. Santiago de Chile, Chile.
- Sobjak, T. M., Romão, S., do Nascimento, C. Z., Dos Santos, A. F. P., Vogel, L., & Guimarães, A. T. B. (2017). Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. *Chemosphere*, 182, 267-275.
- Song, X., Wang, X., & Bhandari, R. K. (2020). Developmental abnormalities and epigenetic alterations in medaka (*Oryzias latipes*) embryos induced by triclosan exposure. *Chemosphere*, 261, 127613.
- Stief, P., Schramm, A., Altmann, D., & de Beer, D. (2003). Temporal variation of nitrification rates in experimental freshwater sediments enriched with ammonia or nitrite. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(1), 63-71.
- Sudová, E., Piačková, V., Kroupová, H., Pijáček, M., & Svobodová, Z. (2009). The effect of praziquantel applied per os on selected haematological and biochemical indices in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 599-605.
- Tabassum, H., Ashafaq, M., Khan, J., Shah, M. Z., Raisuddin, S., & Parvez, S. (2016). Short term exposure of pendimethalin induces biochemical and histological perturbations in liver, kidney and gill of freshwater fish. *Ecological Indicators*, 63, 29-36.
- Tatarazako, N., Ishibashi, H., Teshima, K., Kishi, K., & Arizono, K. (2004). Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environmental Sciences: An International Journal of Environmental Physiology and Toxicology*, 11(2), 133-140.
- Tchoudakova, A., Kishida, M., Wood, E., & Callard, G. V. (2001). Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78(5), 427-439.
- Tew, K. D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Research*, 54(16), 4313-4320.
- Tian, H., Ru, S., Bing, X., & Wang, W. (2010). Effects of monocrotophos on the reproductive axis in the male goldfish (*Carassius auratus*): potential mechanisms underlying vitellogenin induction. *Aquatic Toxicology*, 98(1), 67-73.
- Teng, J., Zhao, J., Zhu, X., Shan, E., Zhang, C., Zhang, W., & Wang, Q. (2021). Toxic effects of exposure to microplastics with environmentally relevant shapes and

- concentrations: Accumulation, energy metabolism and tissue damage in oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution*, 269, 116169.
- Tierney, K. B., Kennedy, C. J., Gobas, F., Gledhill, M., & Sekela, M. (2013). Organic contaminants and fish. In K. B. Tierney, A. P. Farrell, & C. J. Brauner (Eds), *Fish Physiology* (pp. 1-52). Academic Press.
 - Timbrell, J. A., & Marrs, T. C. (2009). Biotransformation of Xenobiotics. In *General and Applied Toxicology* (pp. 1–38). John Wiley & Sons, Ltd.
 - Timme-Laragy, A. R., Van Tiem, L. A., Linney, E. A., & Di Giulio, R. T. (2009). Antioxidant responses and NRF2 in synergistic developmental toxicity of PAHs in zebrafish. *Toxicological Sciences*, 109(2), 217-227.
 - Treberg, J. R., Killen, S. S., MacCormack, T. J., Lamarre, S. G., & Enders, E. C. (2016). Estimates of metabolic rate and major constituents of metabolic demand in fishes under field conditions: methods, proxies, and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 202, 10-22.
 - Turner, C., Sawle, A., Fenske, M., & Cossins, A. (2012). Implications of the solvent vehicles dimethylformamide and dimethylsulfoxide for establishing transcriptomic endpoints in the zebrafish embryo toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(3), 593-604.
 - Uno, T., Ishizuka, M., & Itakura, T. (2012). Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(1), 1-13.
 - USEPA. United States Environmental Protection Agency. (1999). Update of ambient water quality criteria for ammonia. Washington, DC: Office of Water, Office of Science and Technology.
 - Valant, J., & Drobne, D. (2012). Biological reactivity of TiO₂ nanoparticles assessed by ex vivo testing. *Protoplasma*, 249, 835-842.
 - Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57–149.
 - Veldhoen, N., Skirrow, R. C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D. J., Gunderson, M. P., & Helbing, C. C. (2006). The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology*, 80(3), 217-227.
 - Vélez, V. P. P., Esquivel-Hernández, G., Cipriani-Avila, I., Mora-Abril, E., Cisneros, J. F., Alvarado, A., & Abril-Ulloa, V. (2019). Emerging contaminants in trans-American waters. *Revista Ambiente e Água*. 14(6), e2436.
 - Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E. I., & Unlu, E. (2007). Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(3), 286-291.
 - Venturino, A., Anguiano, O. L., Gauna, L., Cocca, C., Bergoc, R. M., & de D'Angelo, A. M. P. (2001). Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity

- in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 130(2), 191-198.
- Venugopal, R., & Jaiswal, A. K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD (P) H: quinone oxidoreductase1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14960-14965.
 - Viant, M. R., Rosenblum, E. S., & Tjeerdema, R. S. (2003). NMR-based metabolomics: a powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. *Environmental Science and Technology*, 37(21), 4982-4989.
 - Vieira, C. E. D., Almeida, M. D. S., Galindo, B. A., Pereira, L., & Martinez, C. B. D. R. (2014). Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotropical Ichthyology*, 12, 153-164.
 - Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E., & dos Reis Martinez, C. B. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 542, 44-56.
 - Vieira, C. E. D., Pérez, M. R., Acayaba, R. D. A., Raimundo, C. C. M., & dos Reis Martinez, C. B. (2018). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195, 125-134.
 - Walker, C.H. Hopkin, S.P., Sibly, R.M., & Peakall., D. B. (2012). *Principles of Ecotoxicology* (4th ed.). Press Taylor y Francis Group.
 - Walsh, E. S., Kreakie, B. J., Cantwell, M. G., & Nacci, D. (2017). A Random Forest approach to predict the spatial distribution of sediment pollution in an estuarine system. *PloS one*, 12(7), e0179473.
 - Wang, C., Huang, W., Lin, J., Fang, F., Wang, X., & Wang, H. (2020). Triclosan-induced liver and brain injury in zebrafish (*Danio rerio*) via abnormal expression of miR-125 regulated by PKC α /Nrf2/p53 signaling pathways. *Chemosphere*, 241, 125086.
 - Wang, D., Zhang, Y., Li, J., Dahlgren, R. A., Wang, X., Huang, H., & Wang, H. (2020). Risk assessment of cardiotoxicity to zebrafish (*Danio rerio*) by environmental exposure to triclosan and its derivatives. *Environmental Pollution*, 265, 114995.
 - Wang, F., Wang, R., Liu, F., & Chen, W. (2019). Gene expression profiles in brain of male juvenile zebrafish (*Danio rerio*) treated with triclosan. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 362, 35-42.
 - Wang, L. Q., Falany, C. N., & James, M. O. (2004). Triclosan as a substrate and inhibitor of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate-sulfotransferase and UDP-glucuronosyl transferase in human liver fractions. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(10), 1162-1169.

- Wang, L., & Gallagher, E. P. (2013). Role of Nrf2 antioxidant defense in mitigating cadmium-induced oxidative stress in the olfactory system of zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 266(2), 177-186.
- Wang, Y., Yang, G., Dai, D., Xu, Z., Cai, L., Wang, Q., & Yu, Y. (2017). Individual and mixture effects of five agricultural pesticides on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 4528-4536.
- Weatherly, L. M., & Gosse, J. A. (2017). Triclosan exposure, transformation, and human health effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 20(8), 447-469.
- Weber, J. M. (2011). Metabolic fuels: regulating fluxes to select mix. *Journal of Experimental Biology*, 214(2), 286-294.
- Wells, J. B., Little, E. E., & Calfee, R. D. (2004). Behavioral response of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to forest fire-retardant chemicals in the laboratory. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(3), 621-625.
- World Health Organization (WHO). (1993). *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 155.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., & Steinberg, C. (2000). Activity development of selected detoxication enzymes during the ontogenesis of the zebrafish (*Danio rerio*). *International Review of Hydrobiology: A Journal Covering all Aspects of Limnology and Marine Biology*, 85(4), 413-422.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, K. A., Steinberg, C. E., & Codd, G. A. (1999). Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology: An International Journal*, 14(1), 89-95.
- Wilhelm, D. (2007). Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 12(4), 1229-1237.
- Wilson, J. M., Bunte, R. M., & Carty, A. J. (2009). Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48(6), 785-789.
- Wirt, H., Botka, R., Perez, K. E., & King-Heiden, T. (2018). Embryonic exposure to environmentally relevant concentrations of triclosan impairs foraging efficiency in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(12), 3124-3133.
- Wu, C., Spongberg, A. L., & Witter, J. D. (2009). Adsorption and degradation of triclosan and triclocarban in soils and biosolids-amended soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4900-4905.
- Wu, Y., Chitranshi, P., Loukotková, L., Gamboa da Costa, G., Beland, F. A., Zhang, J., & Fang, J. L. (2017). Cytochrome P450-mediated metabolism of triclosan attenuates its cytotoxicity in hepatic cells. *Archives of Toxicology*, 91, 2405-2423.

- Xu, J., Wu, L., & Chang, A.C. (2009) Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere* 77, 1299–1305.
- Xu, H., Zhang, X., Li, H., Li, C., Huo, X. J., Hou, L. P., & Gong, Z. (2018). Immune response induced by major environmental pollutants through altering neutrophils in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, 201, 99-108.
- Yadav, D., Rangabhashiyam, S., Verma, P., Singh, P., Devi, P., Kumar, P., Hussain, C.M., Gaurav, G.K., & Kumar, K. S. (2021). Environmental and health impacts of contaminants of emerging concerns: Recent treatment challenges and approaches. *Chemosphere*, 272, 129492.
- Yamauchi, R., Ishibashi, H., Hirano, M., Mori, T., Kim, J. W., & Arizono, K. (2008). Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnane X receptor, and cytochrome P450 3A gene expression in the livers of male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 90(4), 261-268.
- Yu J.C., Kwong T.Y., Luo Q., & Cai Z. (2006). Photocatalytic oxidation of triclosan. *Chemosphere* 65, 390–399.
- Yueh, M. F., Taniguchi, K., Chen, S., Evans, R. M., Hammock, B. D., Karin, M., & Tukey, R. H. (2014). The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(48), 17200-17205.
- Yueh, M. F., & Tukey, R. H. (2016). Triclosan: a widespread environmental toxicant with many biological effects. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56, 251.
- Zhang, Y., Liu, M., Liu, J., Wang, X., Wang, C., Ai, W., & Wang, H. (2018). Combined toxicity of triclosan, 2, 4-dichlorophenol and 2, 4, 6-trichlorophenol to zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 57, 9-18.
- Zhao, J., Mak, P., Tchoudakova, A., Callard, G., & Chen, S. (2001). Different catalytic properties and inhibitor responses of the goldfish brain and ovary aromatase isozymes. *General and Comparative Endocrinology*, 123(2), 180-191.