

Evaluación de la calidad de agua de un sistema lótico y área terrestre de influencia, en relación a respuestas biológicas en la especie íctica *Heptapterus mustelinus*.



**Tesinista:** Natalia Vreys

**Directora:** Dra. Ma. De los Ángeles Bistoni

**Codirectora:** Dra. María Valeria Amé

**Lugar de Trabajo:** Cátedra de Diversidad Animal II (F.C.E.F. y N. – UNC)

22 de diciembre de 2016.

Córdoba, Argentina.



**Evaluación de la calidad de agua de un sistema lótico y área terrestre de influencia en  
relación a respuestas biológicas en la especie íctica *Heptapterus mustelinus*.**

**Tribunal examinador:**

- Dra. María de los Ángeles Bistoni                      Firma:
  
- Dra. Andrea Cecilia Hued                                      Firma:
  
- Dra. Hebe Carreras    Firma:
  
  
- Calificación:
  
  
- Fecha:

## **AGRADECIMIENTOS**

En pocas palabras quisiera agradecer a todas aquellas personas que me acompañaron en esta etapa: familia, amigos, compañeros y docentes. En primer lugar un profundo agradecimiento a mis padres y familia por ser mi sostén y por la confianza que me dieron. El respeto hacia la naturaleza se logra en primera instancia en nuestros hogares, y fue allí donde nació mi vocación. Este logro no hubiese sido posible sin la dirección de Mari Bistoni, a quien respeto y admiro mucho, agradezco su tiempo y dedicación en este trabajo. Además, resaltar la predisposición y colaboración de mi codirectora Vale Amé. Quiero reconocer el papel del tribunal evaluador por los aportes y comentarios enriquecedores, y extender el agradecimiento a la Universidad Nacional de Córdoba por permitir mi formación profesional. Por último quiero agradecer a mis amigos de la vida y los que la facu me dio, por su apoyo incondicional a lo largo de la carrera.

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. Área de estudio y muestreo .....	7
3.2. Metodología.....	8
3.2.1. Calidad del ambiente terrestre .....	8
3.2.2. Calidad del agua .....	12
3.2.3. Biomarcadores .....	14
3.3. Análisis estadísticos .....	20
4. RESULTADOS .....	20
4.1. Calidad del ambiente terrestre .....	20
4.1.1. A nivel regional: Calidad en el uso de la tierra .....	20
4.1.2. A nivel local: Calidad de ribera .....	21
4.2. Calidad del agua.....	22
4.3. Biomarcadores .....	25
4.3.1. Estado general de los peces .....	25
4.3.2. Biomarcadores enzimáticos e indicadores de estrés oxidativo.....	26
4.3.3. Análisis histológicos .....	28
4.4. Análisis de Componentes Principales .....	38
5. DISCUSIÓN.....	40
6. CONCLUSIÓN.....	49

## 1. RESUMEN

A lo largo de su recorrido, la cuenca del río Xanaes colinda con campos agrícolas, industrias, y ciudades que pueden constituirse en fuentes de diversos xenobióticos. El disturbio del ambiente terrestre permite el ingreso de estas sustancias al río, que producen cambios en las características físicas y químicas propias del curso de agua. Los peces son considerados buenos indicadores del funcionamiento de los mismos, siendo vulnerables a los contaminantes acuáticos. La utilización de biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica, se utiliza para entender cómo un organismo responde a la carga total de contaminación. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la relación entre calidad de hábitat y la salud de los individuos de *Heptapterus mustelinus* a través de biomarcadores, en el tramo medio de la cuenca del río Xanaes. Se seleccionaron 3 sitios a lo largo del río (La Bolsa, Despeñaderos, Pilar) y el muestreo fue realizado en la estación hidrológica baja (octubre, 2015). Se capturaron 25 individuos de *H. mustelinus* por sitio, los cuales fueron utilizados para la determinación del estado general de los peces, la actividad enzimática (GST, CAT, AchE), concentración de proteínas carboniladas y respuestas histopatológicas en hígado y branquias. La calidad de hábitat se evaluó a través de índices de calidad de agua (ICAs), plaguicidas en agua, análisis de uso de la tierra y calidad de las riberas. Los ICAs no revelaron diferencias entre sitios de estudio, pero la concentración de plaguicidas total fue mayor en Despeñaderos. A su vez, fue el sitio que presentó peor Calidad de Ribera. Por otra parte, Pilar presentó baja calidad en el Uso de la Tierra, pero buena Calidad de Ribera. Los biomarcadores evaluados de manera individual e integrados en un índice, muestran un deterioro en la calidad del agua en los sitios Despeñaderos y Pilar con respecto a La Bolsa, siendo más marcado en el primero de ellos. El Análisis de Componentes Principales asoció a los índices histopatológicos de branquias e hígado con los sitios de peor calidad del ambiente terrestre mientras que las variables Factor de Condición, Índice Hepatosomático, Glucógeno en hígado, Lípidos en hígado y la AChE<sub>micro</sub> muscular se asociaron con el sitio de mejor calidad del ambiente terrestre (La Bolsa). Investigaciones futuras que amplíen el conocimiento del tipo de contaminantes que están presentes en el cuerpo de agua, son fundamentales para comprender el riesgo al que se expone nuestra fauna.

**Palabras Clave:** *Heptapterus mustelinus*, ambiente terrestre, calidad de agua, biomarcadores.

## 2. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las poblaciones humanas ha estado relacionado a la presencia del agua, siendo las actividades antrópicas las principales fuentes de contaminación de los ambientes acuáticos (Belanger *et al.*, 2016). A nivel regional, el desmonte extensivo de tierras, el pastoreo de ganado, la agricultura y el desarrollo urbano e industrial han conducido a la degradación sustancial del hábitat de los ríos y de la calidad del agua de los mismos (Kutschker, 2009). Los efectos de la transformación de bosques nativos se han relacionado con la pérdida de la vegetación, con la disminución del sombreado y con el incremento de sedimentos y nutrientes que ingresan al ambiente acuático (Strand & Merritt 1999). Las prácticas agrícolas en tierras de cultivo generan potenciales contaminantes que ingresan al río por escorrentía y lixiviación (Harguinteguy *et al.*, 2013). Por otra parte, en los tramos de desarrollo urbano, los ríos son muy vulnerables y presentan marcadas alteraciones a causa de los desechos domésticos, los cuales contienen diversos contaminantes tales como compuestos organoclorados, metales y drogas farmacéuticas (Maceda-Viega *et al.*, 2013). Además, la presencia de industrias implica la descarga de grandes cantidades de efluentes que atentan contra la calidad del agua de manera significativa.

A nivel local, la zona de ribera definida como el terreno que linda con el cauce del río e influye directamente sobre el cuerpo de agua, es considerada zona de transición o interfase entre el ambiente acuático y terrestre (Boulton & Brock, 1999). Estos sistemas cumplen la función de filtro y actúan como sistemas depuradores al evitar la erosión de los suelos, amortiguar el ingreso de contaminantes al agua y regular la temperatura y entrada de luz, lo que repercute en la estructura y la dinámica de los diferentes niveles tróficos (Scarsbrook *et al.* 2001). De esta manera, los ecosistemas fluviales y sus zonas adyacentes dependen en gran medida uno de otro, y la más ligera modificación (natural o antrópica) en esta relación puede conducir a cambios drásticos en la dinámica de procesos bióticos y abióticos (Naiman *et al.*, 2005). La perturbación del ambiente por actividades humanas modifica los componentes del ciclo hidrológico acelerando las escorrentías, de manera dependiente con la pendiente del valle por donde discurre el río (González del Tánago del Río & García de Jalón Lastra, 1998).

Los principales elementos que ingresan a los ambientes acuáticos son contaminantes orgánicos y/o inorgánicos como solventes, aceites, metales pesados, plaguicidas, fertilizantes, sólidos suspendidos, entre otros (Pandey *et al.*, 2003). El ingreso de sustancias al río trae como consecuencia cambios en las características físicas y químicas propias del curso de agua. El uso de índices que contemplen diversas variables físicas y químicas permite determinar la calidad del recurso e identificar tendencias (Pesce & Wunderlin, 2000).

La exposición de la biota a diferentes compuestos químicos es especialmente preocupante debido a la larga lista de contaminantes regulados y emergentes presentes en los ambientes acuáticos (von der Ohe, 2011). Si bien la mayoría de estos compuestos pueden medirse de manera cuantitativa, no es viable detectar y cuantificar todos los contaminantes que están presentes en un río. Además, el análisis químico por sí sólo no revela el impacto de la contaminación química en el ambiente acuático por el potencial efecto sinergismo/antagonismo de las complejas mezclas presentes en esos ambientes (Kerambrun *et al.*, 2011). De esta manera, la biota se ve expuesta a multi-estresores (Colin *et al.*, 2015). Los estudios de biomonitoreos representan una técnica complementaria, que consideran el análisis de especies indicadoras (Friberg *et al.*, 2011). Entre ellas, los peces son considerados buenos indicadores del estado y funcionamiento de los mismos siendo vulnerables a los contaminantes acuáticos (Abdel-Moneim *et al.*, 2012). Son bioindicadores fiables debido a que ocupan diversos niveles tróficos, acumulan contaminantes y reflejan impactos a largo plazo teniendo en cuenta la longitud de su ciclo de vida (Jorgensen, 2011).

Previo a la muerte de los organismos o a la presencia de enfermedad manifiesta, éstos responden al estrés ambiental mediante respuestas a nivel molecular, fisiológico y comportamental (Livingstone, 1993), las cuales pueden alterar el desarrollo normal de actividades vitales tales como la alimentación, reproducción o evasión de predadores (Little & Finger, 1990). La capacidad de reconocer y medir estas respuestas, definidas como biomarcadores, significa una alerta temprana antes de llegar a consecuencias más graves y difíciles de reparar. El análisis de un solo biomarcador no ofrece una diagnosis completa del efecto de los contaminantes sobre los organismos. El uso de una batería de biomarcadores complementarios, es recomendado para entender cómo un organismo responde a la carga total de contaminación (Cazenave *et al.*, 2009).

Entre los biomarcadores, el estado general de los individuos es frecuentemente utilizado para evaluar el efecto del estrés ambiental sobre la biota. Se registra a través de índices específicos tales como el Factor de Condición y el Índice Hepatosomático (van der Oost *et al.*, 2003). El Factor de Condición puede ser afectado si la disponibilidad de alimentos es limitada o si el consumo de comida por parte de pez disminuye debido a factores de estrés. Las variaciones en el Índice Hepatosomático se deben a que existe una relación causal entre el tamaño y peso del hígado y la exposición a contaminantes químicos. Por otra parte, el estado general de los individuos contempla el balance en el consumo de reservas energéticas. Los peces, por lo general, hacen frente a la privación de la alimentación mediante la reorientación de las reservas energéticas hacia procesos vitales en detrimento del crecimiento

(Sumpter *et al.*, 1991). Esta movilización de las reservas almacenadas en músculos esqueléticos y el hígado, permite soportar el aumento de la demanda de energía asociada con el estrés (Menezes *et al.*, 2015). Además, la tolerancia al ayuno se relaciona con la tasa de consumo de las macromoléculas de reserva energética (glucógeno, lípidos y proteínas) en estos tejidos (Liew *et al.*, 2012).

Frente a un evento de estrés inducido por tóxicos, las primeras respuestas se generan a nivel molecular. Los biomarcadores más estudiados a este nivel son aquellas enzimas involucradas tanto en el sistema de biotransformación, como en el sistema antioxidante (Sijm & Opperhuizen, 1989; van der Oost *et al.*, 2003). La vía de detoxificación más frecuentemente estudiada es la que involucra la enzima de biotransformación glutatión-S-transferasa (GST), presente principalmente en la fracción citosólica del hígado (Sijm & Opperhuizen, 1989). El proceso de biotransformación ocurre en dos etapas: la fase I, donde los grupos funcionales de los compuestos extraños son transformados en otros de mayor polaridad, y la fase II donde ocurren las reacciones de conjugación. La GST interviene en la segunda fase del metabolismo e involucra la conjugación del xenobiótico proveniente de la fase I con ligandos endógenos (glutatión-GSH) para iniciar su biotransformación, facilitando su subsecuente eliminación del cuerpo vía urinaria o biliar (van der Oost *et al.*, 2003). Por otra parte, frente al estrés oxidativo existen enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT) que tienden a inhibir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), a través de reacciones redox (van der Oost *et al.*, 2003; Di Giulio & Meyer, 2008). Particularmente la CAT se encarga de la conversión del  $H_2O_2$  en  $O_2$  y agua. Su actividad se ve afectada en gran medida cuando el pez se encuentra expuesto a aguas contaminadas (Ansari & Ansari, 2014). El daño oxidativo puede medirse cuantificando los productos finales de su acción oxidante sobre proteínas, ADN y lípidos. Las ROS inducen una acumulación de grupos carbonilos en proteínas, mientras que en los lípidos produce la peroxidación pudiendo afectar principalmente a las membranas celulares (destrucción celular) (Ochoa & González, 2008).

Otras enzimas utilizadas como biomarcadores en peces son las colinesterasas, que se relacionan con la transmisión del impulso nervioso y la función neuromuscular, y por lo tanto con el movimiento. La Acetilcolinesterasa (AChE) se encarga de degradar, en las terminales nerviosas, el neurotransmisor acetilcolina (ACh) en colina y ácido acético (Di Giulio & Hinton, 2008). La alteración de la AChE producida por xenobióticos causa una amplia gama de signos de intoxicación incluidos cambios en la temperatura corporal, frecuencia cardíaca, presión arterial, generación de espasmos musculares o temblores y comportamiento natatorio



alterado. La muerte, aunque es rara, se debe al cese de la respiración producto de la inhibición de la enzima en el SNC y SNP (Bradbury *et al.*, 2008).

Un biomarcador cuya ventaja radica en su ubicación intermedia con respecto al nivel de organización biológica, es la histopatología (Adams *et al.*, 1989). Respuestas histopatológicas en diversos órganos son una herramienta sensible para detectar los efectos tóxicos directos de compuestos químicos en órganos blanco de peces (van der Oost *et al.*, 2003; Au, 2004). Se han observado alteraciones en branquias (Abalaka *et al.*, 2015), hígado (Oliveira *et al.*, 2015), riñón (Camargo & Martinez, 2007), entre otros.

Las branquias y el hígado son los órganos que responden con mayor rapidez frente a eventos de contaminación (Schlenk *et al.*, 2008). Las branquias son consideradas órganos multifuncionales encargados de la respiración, la ion-regulación, regulación ácido-base y la excreción de desechos nitrogenados (Wood, 2001). Poseen una gran superficie respiratoria (laminillas), la cual representa una importante área de contacto entre los peces y el ambiente acuático que además de facilitar el intercambio eficiente de gases respiratorios e iones, tiene la potencialidad de sufrir efectos de agentes tóxicos que ingresan al organismo a través de ella. Estos tóxicos pueden producir daños en la estructura branquial y alteraciones en su función (Wendelaar Bonga & Lock, 2008). Las alteraciones morfológicas más frecuentes de observar son: hiperplasia e hipertrofia de células epiteliales, de las células mucosas y de las células de cloro, fusión de laminillas secundarias, lifting epitelial, necrosis, aneurismas, etc. (Mallat, 1985).

El hígado es el órgano encargado del mantenimiento de la homeostasis del organismo. Entre sus funciones se destacan el metabolismo normal, almacenamiento y redistribución de nutrientes y otras moléculas endógenas (reservas energéticas), el metabolismo de xenobióticos, formación y excreción de la bilis (Hinton *et al.*, 2001). Cuando los tóxicos que ingresan al cuerpo del organismo superan su capacidad de detoxificación, tienden a acumularse provocando alteraciones en la estructura del hígado. Entre las alteraciones morfológicas se pueden mencionar: degeneración hidrópica, metamorfosis grasa, necrosis, fibrosis, congestión y dilatación de sinusoides, etc. (Hinton *et al.*, 2001).

El escenario planteado en los ambientes acuáticos, sobre la presencia de multi-estresores, está presente en los ríos de la Provincia de Córdoba (Valdes *et al.*, 2014). Entre ellos, la cuenca endorreica del río Xanaes muestra en su recorrido signos de una variada influencia antrópica (asentamientos de ciudades, cultivos, industrias, modificación del cauce del río, etc.). Los escasos trabajos previos sobre contaminación realizados en esta cuenca, se centran en el análisis de metales pesados. Bermúdez *et al.* (2010, 2011, 2012) señalan altas

concentraciones de estos elementos en aire y en la capa superficial del suelo. Por su parte, Harguinteguy *et al.* (2013) señalan que los plaguicidas utilizados en la agricultura son una fuente importante para el ingreso de metales al río Xanaes, en conjunto con el lavado de los suelos y el volcamiento de efluentes.

De acuerdo a la problemática expuesta, a través de este estudio se procuró evaluar la relación entre calidad de hábitat y la salud de la fauna íctica de un sistema lótico. Para ello, se utilizó como bioindicador al pez autóctono *Heptapterus mustelinus* (n.v. Bagre Anguila) (Siluriformes, Heptapteridae). Este bagre es de amplia distribución en América del Sur, estando presente en las diferentes secciones del río Xanaes (Haro & Bistoni, 2007). Es un pez insectívoro, bentónico, de aguas rápidas y poco profundas (Fernandez & Bechara, 2010) (Fig. 1).



Fig. 1: *Heptapterus mustelinus* (n.v. Bagre Anguila)

En la bibliografía existe controversia sobre si es una especie sensible o tolerante a la contaminación ambiental. Cunico *et al.* (2006) y Vieira & Shibatta (2007) la señalan como resistentes a cambios en la calidad del agua, especialmente a altas concentraciones de fósforo, bajo oxígeno disuelto y baja profundidad, producto de variaciones de hábitat e impactos ambientales. En contraposición, Fernandez & Bechara (2010) y Chalar (2013) mencionan que *H. mustelinus* es indicador de poco daño ambiental, ya que suele encontrarse en hábitats más prístinos y es generalmente sensible a condiciones adversas de contaminación antrópica. Fernandez & Bechara (2010) a su vez, afirman que el bagre anguila a pesar de requerir altos niveles de oxígeno suele ser más tolerantes a temperaturas cálidas o de alto nivel de Demanda Química de Oxígeno.

Considerando lo antedicho, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la relación entre calidad de hábitat y la salud de los individuos de *H. mustelinus* a través de biomarcadores, a diferentes niveles de organización biológica, a lo largo del tramo medio de la Cuenca del río Xanaes.

### Objetivos Específicos:

- Determinar la calidad del ambiente terrestre a nivel regional y local a lo largo del tramo medio de la Cuenca del Río Xanaes.
- Determinar la calidad del agua basada en parámetros físicos, químicos y bacteriológicos a lo largo del tramo medio de la Cuenca del Río Xanaes.
- Determinar el estado general de *H. mustelinus* a lo largo del tramo medio de la Cuenca del Río Xanaes.
- Determinar alteraciones histológicas en hígado y branquias en individuos de *H. mustelinus* recolectados a lo largo del tramo medio de la Cuenca del Río Xanaes.
- Analizar los cambios en biomarcadores enzimáticos e indicadores de estrés oxidativo de diferentes órganos de *H. mustelinus* recolectados a lo largo del tramo medio de la Cuenca del Río Xanaes.
- Relacionar la calidad del ambiente terrestre con los biomarcadores medidos en *H. mustelinus*.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### **3.1. Área de estudio y muestreo**

El área de estudio comprende la sección media de la cuenca del río Xanaes, presente en la región central de Argentina, provincia de Córdoba (Fig. 2) Este sistema se forma por la confluencia de los siguientes cursos de agua: De la Suela, Los Condoritos (que recorre el Parque Nacional Quebrada del Condorito), San José, San Pedro, Los Espinillos, Medio, Los Reartes, Los Molinos y Anizacate. Los últimos dos, son los principales de la cuenca y a partir de la confluencia de ambos, en las cercanías de la ciudad de Despeñaderos, se forma el río Xanaes propiamente dicho. El río Xanaes recorre 345 km hasta desembocar en la Laguna Mar Chiquita. El flujo medio es de  $14,5 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  con lluvias estacionales más pronunciadas al final de la primavera y verano (Vázquez *et al.*, 1979).

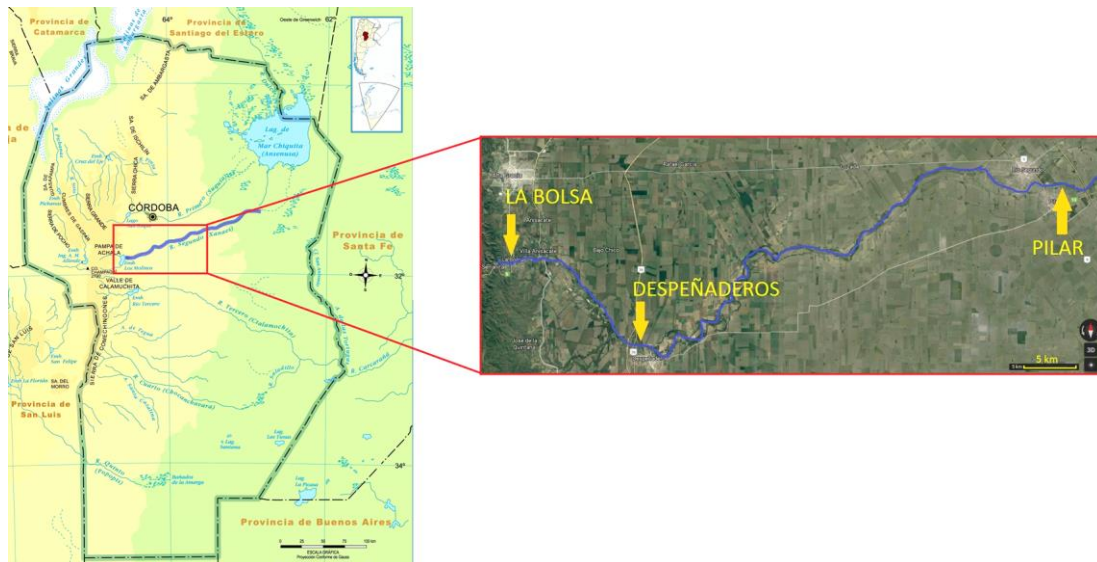


Fig. 2: Mapa de la Provincia de Córdoba. Se detalla el tramo medio de la cuenca del río Xanaes. Sitios de muestreo: La Bolsa, Despeñaderos y Pilar.

### 3.2. Metodología

Se determinaron tres sitios de muestreo: La Bolsa ( $31^{\circ}43'29.1''S$  -  $64^{\circ}26'00.6''W$ ), Despeñaderos ( $31^{\circ}48'11.94''S$  -  $64^{\circ}18'35.98''O$ ) y Pilar ( $31^{\circ}39'45.77''S$  -  $63^{\circ}52'29.67''O$ ) (Fig. 2). La Bolsa es una localidad con baja densidad poblacional, considerada el sitio que menor impacto antrópico recibe. En Despeñaderos, ubicado a 20,8 km aguas abajo de La Bolsa, se encuentra la ciudad homónima y campos agrícolas (principal actividad económica de la localidad). El área de estudio en Pilar (80,2 km aguas abajo de La Bolsa), abarca dos ciudades (Pilar y Río Segundo) y la zona presenta actividad agrícola y asentamientos industriales.

El muestreo se realizó a principios de octubre del 2015, momento en el cuál no se habían registrado grandes lluvias por lo que se considera época de bajo caudal (20,5 mm contra 124,42 mm en época húmeda) (INTA, 2015).

Se recolectaron 25 ejemplares de bagre anguila (*H. mustelinus*) mediante un equipo de pesca eléctrica, en cada sitio muestreado. Los peces fueron trasladados al laboratorio en agua tomada de cada sitio para su posterior procesamiento.

#### 3.2.1. Calidad del ambiente terrestre

##### 3.2.1.1. A nivel regional: Calidad en el uso de la tierra

Se evaluaron en cada sitio de estudio indicadores de calidad del uso de la tierra en un círculo de 5 km de radio, tomando como punto central el lugar de captura de los individuos (Díaz-Jaramillo *et al.*, 2010) (Fig. 3). Para determinar el uso de la tierra se diseñó un índice con los siguientes indicadores: cobertura vegetal (árboles y arbustos), presencia de cultivos y

de construcciones. El porcentaje de cada uno de ellos se calculó a través de las hectáreas ocupadas por cada indicador en la superficie marcada, mediante el uso de imágenes satelitales de Google Earth Pro.

El porcentaje de cada indicador fue valorado con la siguiente puntuación: Cobertura vegetal de 0 a 40 (máximo valor, mayor porcentaje de cobertura), presencia de cultivo de 0 a 30 (máximo valor, menor porcentaje de cultivo) y presencia de construcciones de 0 a 30 (máximo valor, menor porcentaje de construcciones) (Tabla 1). Los rangos de porcentaje fueron tomados de Kutschker *et al.* (2009) y de Corigliano (2008). La suma del puntaje de todos los indicadores determina el valor del Índice de Uso de Tierra (IUT), el cual varía entre 0-100, siendo 100 la mejor calidad. Con el mayor puntaje asignado a la cobertura vegetal, se destaca y prioriza el papel de la vegetación como elemento estructural del ecosistema. Este índice fue calculado en cada sitio de muestreo.



Fig.3: Áreas para evaluar uso de la tierra en cada sitio muestreado. A: La Bolsa, B: Despeñaderos, C: Pilar.

Tabla 1: Puntajes para cada indicador, según su porcentaje de cobertura en el área considerada (círculo de 5 km de radio).

<b>Cob. Vegetal (%)</b>	<b>PUNTAJE</b>	<b>Construcciones (%)</b>	<b>PUNTAJE</b>	<b>Cultivo (%)</b>	<b>PUNTAJE</b>
<b>81 a 100</b>	40	<b>81 a 100</b>	0	<b>81 a 100</b>	0
<b>51 a 80</b>	30	<b>51 a 80</b>	10	<b>51 a 80</b>	10
<b>11 a 50</b>	15	<b>11 a 50</b>	20	<b>11 a 50</b>	20
<b>0 a 10</b>	0	<b>0 a 10</b>	30	<b>0 a 10</b>	30

Por otra parte, se midió en cada uno de los sitios la pendiente promedio del terreno marcado en el círculo de 5 km de radio. Para ello se importaron los círculos a Idrisi v17 Selva, se convirtieron a polígonos y se rasterizaron a un tamaño de pixel de 1 x 1 km aproximadamente. Luego se extrajo el valor promedio de la pendiente dentro de cada círculo,

a partir de un mapa de pendientes desarrollado de un Modelo de Elevación Digital de la NASA.

### 3.2.1.2. A nivel local: Calidad de ribera

Para la calidad de ribera se consultaron los trabajos realizados por Munné *et al.* (2003) y Kutschker *et al.* (2009), y se realizaron modificaciones considerando las características propias del área de estudio. La calidad de ribera (CR) fue evaluada en una transecta de 500 m de longitud paralela a la costa, comenzando desde el sitio de captura de los peces en dirección río arriba. El ancho de la misma fue determinado para cada sitio de muestreo a través de un mapeo *in situ* según el área que se inunda en crecidas de gran magnitud (Fig. 4). Se consideraron ambas riberas por separado a fin de evaluar asimetrías en las mismas.

En las áreas delimitadas, se utilizaron los siguientes indicadores: cobertura vegetal (árboles y arbustos) y naturalidad del canal fluvial. Para la cobertura vegetal, el porcentaje se calculó a través de las hectáreas ocupadas en la superficie marcada, mediante el uso de imágenes satelitales de Google Earth Pro. Este indicador toma valores de 0 a 25 (con penalizaciones de -5 por la presencia de construcciones y de -10 por la presencia de cultivos). En el caso de obtener un resultado negativo el valor del indicador fue llevado a cero de acuerdo a lo propuesto por Munné *et al.* (2003) (Tabla 2). El indicador de naturalidad del canal fluvial fue determinado visualmente en cada sitio muestreado teniendo en cuenta signos de alteración del canal y de las terrazas adyacentes. Este indicador toma valores de 0 a 25 (Tabla 3). La suma de los indicadores determina el valor del índice Calidad de Ribera (CR). Al considerar la ribera izquierda y derecha por separado, se sumó el valor obtenido en cada una de ellas para obtener el valor CR de cada sitio de muestreo, el cual varía entre 0 y 100, siendo 100 la mejor calidad (Tabla 4).

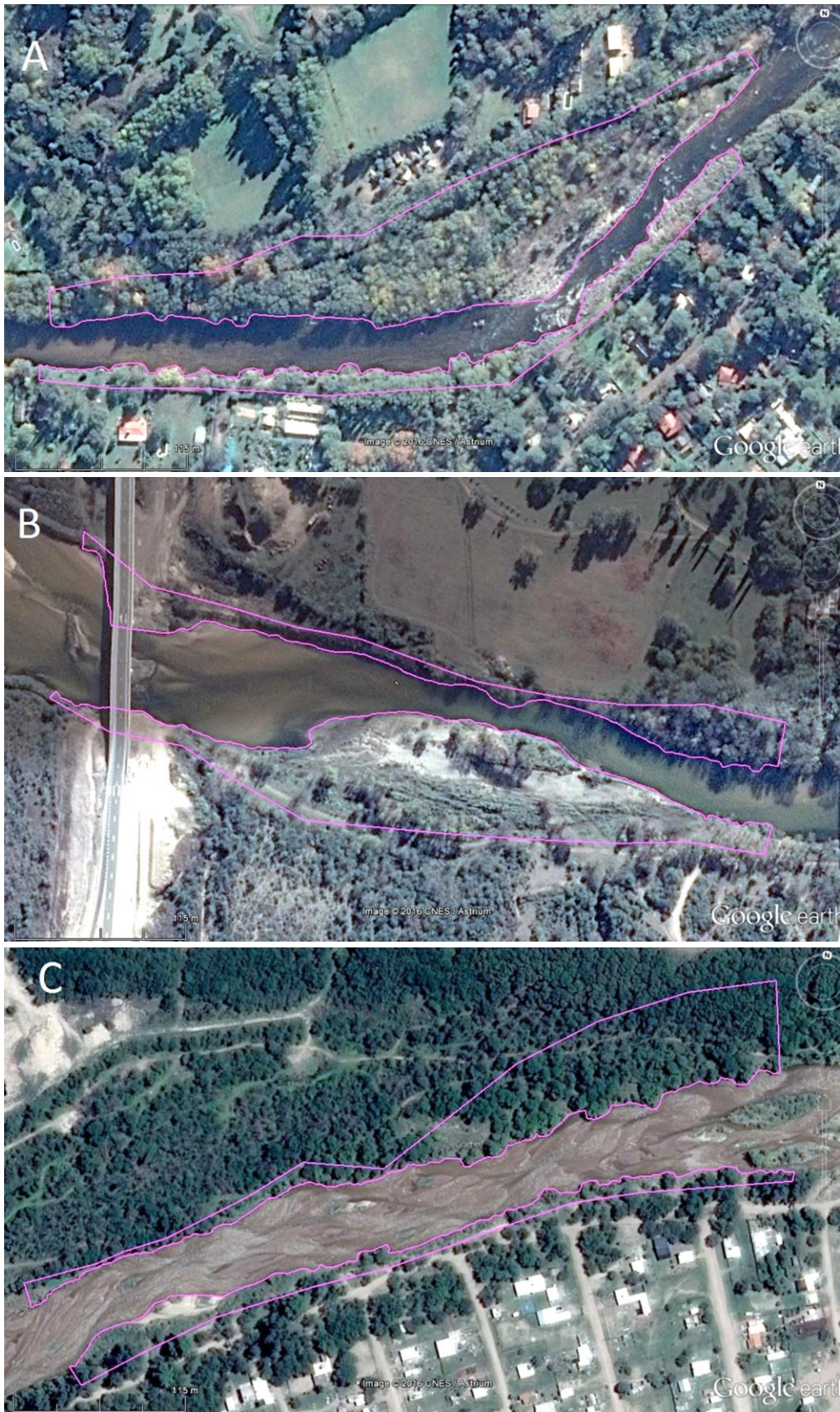


Fig. 4: Áreas mapeadas correspondientes a las riberas. A: La Bolsa. B: Despeñaderos. C: Pilar

Tabla 2: Puntaje correspondiente al porcentaje de cobertura vegetal obtenido en la superficie de ribera, siguiendo a Kutschker *et al.* (2009) con modificaciones.

<b>Cob. Vegetal (%)</b>	<b>PUNTAJE</b>
<b>81 a 100</b>	25
<b>51 a 80</b>	20
<b>11 a 50</b>	15
<b>0 a 10</b>	10

Tabla 3: Puntajes para el indicador naturalidad del canal fluvial de acuerdo a las condiciones observadas, basado en Kutschker *et al.* (2009).

<b>CONDICIÓN</b>	<b>PUNTAJE</b>
<b>El canal del río no ha estado modificado.</b>	25
<b>Modificaciones de las terrazas adyacentes sin reducción del canal.</b>	20
<b>Modificaciones de las terrazas adyacentes al lecho del río con reducción del canal.</b>	15
<b>Signos de alteración y estructuras que modifican el canal.</b>	10
<b>Estructuras transversales.</b>	5
<b>Río canalizado en la totalidad del tramo.</b>	0

Tabla 4: Valoración de la calidad de ribera (CR) en función del puntaje obtenido, basada en Kutschker *et al.* (2009) y Corigliano (2008).

<b>VALOR CR</b>	<b>JUICIO</b>	<b>CALIDAD</b>
<b>91 a 100</b>	Sin alteraciones, estado natural	Muy buena
<b>71 a 90</b>	Ligeras perturbaciones	Buena
<b>51 a 70</b>	Inicio de alteraciones importantes	Moderada
<b>26 a 50</b>	Alteración intensa	Mala
<b>0 a 25</b>	Degradación extrema	Pésima

### 3.2.2. Calidad del agua

En cada sitio de muestreo se midieron *in situ* las variables temperatura, oxígeno disuelto y conductividad del agua mediante una sonda multiparamétrica Multiline F/SET3 (WTW, Weilheim, Germany). Conjuntamente, se extrajo una muestra de agua para una posterior caracterización química y biológica teniendo en cuenta los siguientes parámetros:



concentración de nitritos, nitratos, amonio, magnesio, calcio, sulfato, cloruros y coliformes totales (APHA *et al.*, 1998). Además, se midieron los siguientes plaguicidas y sus metabolitos: 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, alfa-clordane, gamma-chlordane, alfa-Hexachlorocyclohexane, delta-exachlorocyclohexane, gamma-Hexachlorocyclohexane, Chlorbenzilate, Chloroneb, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Dimethyltetrachloroterephthalate (DCPA), cis-Permethrin, trans-Permethrin, alfa-Endosulfán, beta-Endosulfán, Endosulfan Sulfate, Hexachlorobenzene (HCB), Heptachlor, HeptachlorEpoxide, Methoxychlor, Propachlor, Trifluralin. Las mediciones fueron realizadas por personal del laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Químicas (CIBICI-CONICET).

Con los parámetros físicos, químicos y bacteriológicos medidos se calculó el Índice de Calidad del Agua Objetivo ( $ICA_{obj}$ ) y el Subjetivo ( $ICA_{sub}$ ), de acuerdo con Pesce & Wunderlin (2000). Estos índices describen un valor adimensional que refleja un conjunto global de parámetros físicos, químicos y bacteriológicos. Varían entre 0 y 100, siendo 100 la mejor calidad. Para su cálculo se requiere la normalización de cada parámetro en una escala de 0-100, para evitar interferencias derivadas de las diferentes magnitudes que presentan los parámetros medidos. El  $ICA_{obj}$  considera cada parámetro y los pondera, lo que refleja la importancia relativa de cada uno de éstos en la calidad de agua. El  $ICA_{sub}$  se obtiene al multiplicar el valor obtenido a través del  $ICA_{obj}$  con una constante subjetiva ( $k$ ) que contempla aspectos no considerados ni relacionados con el  $ICA_{obj}$ . Estos aspectos representan la impresión visual de contaminación de los ríos. Los criterios que se tuvieron en cuenta para asignar el valor  $k$ , en cada sitio muestreado, fueron:

- 1 = Agua sin contaminación aparente (transparente o con sólidos suspendidos naturales).
- 0,75 = Baja contaminación del agua (aparente), indicada por tenue color no natural, presencia de espuma, ligera turbidez.
- 0,50 = Agua aparentemente contaminada, indicado por color no natural, poco a moderado olor, alta turbidez, sólidos orgánicos disueltos.
- 0,25 = Alta contaminación del agua (aparente), indicada por color negruzco, olor fuerte, fermentación visible, etc.

La extracción para la identificación de plaguicidas se realizó por duplicado según Bonansea *et al.* (2013). Brevemente, las muestras fueron filtradas y sometidas a extracción en

fase sólida usando cartuchos C-18 (SPE, Lichrolut C18, Merck) utilizando acetonitrilo y metanol para la elución. Los extractos fueron analizados por Cromatografía Gaseosa (CG) con un detector de captura de electrones (CG-DCE). La identificación y cuantificación se realizó mediante calibración externa, utilizando estándares de los plaguicidas anteriormente mencionados y sus metabolitos. El porcentaje de recuperación del método de extracción fue del  $79 \pm 7 \%$  (Bonansea *et al.*, 2013).

### 3.2.3. Biomarcadores

#### 3.2.3.1. Estado general de los peces

De cada ejemplar de *H. mustelinus* se registró la longitud estándar (LE) y peso total del pez ( $P_{corp.}$ ) y del hígado ( $P_{hig.}$ ). Como consecuencia de la muerte de algunos ejemplares durante el traslado del campo al laboratorio, la LE,  $P_{corp.}$  y  $P_{hig.}$  fue registrado para 17 individuos de La Bolsa, 20 individuos de Despeñaderos y 25 individuos de Pilar. Para cada uno de ellos se calculó el Factor de Condición de Fulton (FC), el cual relaciona el peso y la longitud de los individuos y el Índice Hepatosomático (IHS), el cual relaciona el peso del hígado con respecto al peso corporal (van der Oost *et al.*, 2003).

$$FC = P_{corp.} / LE^3 * 100.000 \quad IHS = (P_{hig.} / P_{corp.}) * 100$$

Por otro lado, se registró el contenido de glucógeno, lípidos y proteínas en hígado y músculo de 12 individuos (4 de cada sitio), con el fin de evaluar el consumo de energía. El glucógeno se estimó según Seifter *et al.* (1950). Se utilizaron 20 mg de hígado y 60 mg de tejidos musculares para ser tratados con 1 mL 30 % de KOH y 0,5 mL 60 % de KOH a 100 °C. Luego de la disrupción alcalina del tejido, el glucógeno fue precipitado en etanol y la glucosa se determinó utilizando el método reactivo de antrona. El contenido de lípidos fue extraído usando cloroformo: metanol (2:1) por el método descrito por Floch *et al.* (1957) y la concentración total de proteína en tejido se estimó de acuerdo con Lowry *et al.* (1951). Este método combina la reacción de iones de cobre con los enlaces peptídicos en un medio alcalino (test de Biuret) con la oxidación de residuos aromáticos de las proteínas, usando el reactivo de Folin-Ciocalteu. El espectro de absorción del reactivo de Folin reducido presenta un máximo de absorción a 660 nm y su intensidad es proporcional a la de proteínas que existe en la muestra. Para el cálculo de concentración de proteínas se llevó a cabo una curva de calibración, usando albúmina de suero bovino (Sigma) como estándar. Las mediciones fueron realizadas por personal del Laboratorio de Ictiología, Instituto Nacional de Limnología (INALI-CONICET- UNL), Santa Fe, Argentina.

### 3.2.3.2. Biomarcadores enzimáticos e indicadores de estrés oxidativo

Los extractos enzimáticos de cada órgano (branquias, hígado, cerebro y músculo) se prepararon a partir de peces individuales según Cazenave *et al.* (2006). Brevemente, los tejidos se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio usando solución tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,5 que contiene 20% (v / v) de glicerol, 1mM EDTA y 1.4mM Ditioneritrol (DTE). Los restos celulares se removieron por centrifugación (10 min a 13.000 g, 4 °C). Luego se separaron las enzimas presentes en la fracción de membrana de los extractos mediante centrifugación a 105.000 g por 60 min a 4°C. El sobrenadante obtenido, correspondiente a la fracción citosólica, y el pellet (fracción microsomal) resuspendido en solución fosfato de sodio 20 mM, pH 7 fueron utilizados para la medición de actividad enzimática mediante espectrofotometría. Los extractos fueron conservados a -80°C hasta su posterior utilización.

Se midió la actividad de las enzimas Glutación S-transferasa (GST), Catalasa (CAT) y Acetilcolinesterasa (AChE) en los órganos correspondientes a 14 peces (5 individuos de La Bolsa, 4 de Despeñaderos y 5 de Pilar), la GST y la AChE fueron medidas tanto en la fracción citosólica como en la microsomal de cada órgano. El contenido de Proteínas Carboniladas (ProtCarb) fue medido en el músculo de 15 individuos (5 por sitio).

La actividad enzimática se determinó por triplicado para cada órgano utilizando un Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HT, Biotek. La actividad de GST se determinó en fracción a 340 nm, usando Glutación reducido (GSH) como sustrato y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) como cromógeno, de acuerdo con Habig *et al.* (1974). La actividad de CAT se realizó por el método de Beutler (1982) utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato. La actividad de AChE se determinó a 412 nm utilizando Acetilcolina como sustrato y DTNB como cromógeno de acuerdo a Ellmann (1961). La actividad enzimática se expresa en nanokatales por miligramo de proteína (nkat/mg prot), en donde 1 katal es la conversión de un mol de sustrato por segundo. El contenido de proteínas carboniladas fue determinado por la reacción de los grupos carbonilos del extracto proteico de los músculos con 2,4-dinitrofenilhidrazina según Levine *et al.* (1990). El contenido de proteínas de los extractos se midió por el método de Bradford (1976).

Los biomarcadores enzimáticos e indicadores de estrés oxidativo y los descriptos en la sección 3.2.3.1. (*Estado general del pez*), fueron combinados en un índice de estrés “Respuesta de Biomarcadores Integrados” (RBI) propuesto por Beliaeff & Burgeot (2002), y modificado por Devin *et al.* (2014). El RBI es un método que proporciona una síntesis gráfica

de las diferentes respuestas de biomarcadores y un valor numérico que integra todas estas respuestas a la vez. Es la suma del área definida por los k biomarcadores dispuestos en un diagrama de estrella, siguiendo un paso previo de estandarización de los biomarcadores. El cálculo de RBI se describe en 4 pasos propuestos por Devin *et al.* (2014):

1. El valor medio de un sitio (X) se normalizó utilizando el valor medio para todos los sitios (m) y la desviación estándar (s) para todos los sitios, para producir un valor que llamamos Y:  $Y = (X - m) / s$
2. Para cada biomarcador, calculamos el valor  $Z = Y$  o  $Z = - Y$  de acuerdo con la activación del efecto biológico esperado o inhibición del mismo, respectivamente.
3. El valor de S se calculó con  $S = Z + | \text{Min} |$ , donde Min es el valor mínimo observado para todos los sitios, para cada biomarcador.
4. Finalmente, todos los valores de  $S_i$  se trazaron en un diagrama de estrella. El RBI se calcula como el área total mostrada por el diagrama de estrella. El área del triángulo definida por dos biomarcadores sucesivos en un estudio de k biomarcadores se define en:

$$A_i = S_i \times S_{i+1} \times \text{sen}(2 \pi/k)/2$$

Y el RBI es calculado de la siguiente manera:

$$\text{RBI} = \sum_{i=1}^k A_i$$

Todo el procedimiento de cálculo y representación de los se realizó con programas clásicos de hojas de cálculo. Los valores más altos del índice revelan mayores afecciones.

### 3.2.3.3. Análisis histológico

Se sacrificaron 15 peces (5 de cada sitio), los cuales fueron diseccionados extrayendo un arco branquial y el hígado. Los mismos fueron fijados con formalina, incluidos en parafina y coloreados con hematoxilina-eosina (HE), según el protocolo descrito en las técnicas de rutina. Los preparados se observaron en un microscopio óptico (Olympus X-785) y fueron fotografiados con una cámara digital (Moticam Camera 2300, 3 Megapixels).

De cada individuo, se observaron daños en 5 laminillas primarias seleccionadas al azar y de cada una de ellas se observaron 10 laminillas secundarias ubicadas en la sección media del filamento primario. Se calculó por individuo la frecuencia de laminillas primarias afectadas, por cada uno de los daños, considerando que las 10 laminillas secundarias examinadas por cada primaria representan el 100% de la superficie analizada. El porcentaje de daño final para

cada individuo fue el promedio de cada alteración, obtenido de los cinco filamentos primarios observados. Para el análisis histológico del hígado, se analizaron por individuo 5 áreas al azar sin superposición a una magnitud 40X en el microscopio. Se registraron los daños y se estimó el porcentaje de superficie ocupado por los mismos. Las alteraciones histopatológicas encontradas se evaluaron semicuantitativamente, utilizando el índice elaborado por Bernet *et al.* (1999). Este índice realiza una cuantificación estandarizada de los daños, lo que facilita la interpretación de datos ya que permite el análisis de daños en cada órgano por separado y en conjunto. Los valores más altos del índice revelan mayores afecciones. Las alteraciones patológicas observadas en cada órgano se clasificaron en cuatro categorías llamadas patrones de reacción (Pr) (Bernet *et al.*, 1999):

- **Pr 1- Disturbios Circulatorios:** Resultado de alteraciones patológicas en la sangre. Ej: hemorragias, aneurismas, congestión vascular.
- **Pr 2- Cambios Regresivos:** Procesos que conducen a la reducción o pérdida total de la funcionalidad del órgano. Ej: atrofas en estructuras de tejidos, disfunción celular, necrosis, etc.
- **Pr 3- Cambios Progresivos:** Procesos que llevan a un incremento en la actividad de células o tejidos. Ej: hipertrofia e hiperplasia.
- **Pr 4- Inflamación:** Procesos asociados generalmente a alteraciones pertenecientes a otros patrones de reacción. Ej: edemas, infiltración leucocitaria, etc.

Por otro lado, este índice considera el factor de importancia de cada lesión (W) en función de cuánto afecta a la funcionalidad del órgano o a la supervivencia del pez (Tabla 5 y 6). Este factor puede adoptar 3 valores:

- **W=1:** Importancia patológica mínima (la lesión es fácilmente reversible cuando finaliza la exposición al tóxico)
- **W=2:** Importancia patológica moderada (la lesión puede o no ser reversible dependiendo de la severidad y extensión de la misma)
- **W=3:** Importancia patológica marcada (la lesión es irreversible, conduciendo a una pérdida parcial o total de las funciones del órgano).

Tabla 5: Valor del factor de importancia (W) asignado a cada alteración histológica observadas en branquias.

PATRÓN DE REACCIÓN	ALTERACIONES HISTOLÓGICAS	W
<b>Disturbios Circulatorios</b>	Aneursima lamelar	1
	Lifting de células pavimentosas	1
<b>Cambios Regresivos</b>	Fusión de laminillas secundarias (parcial o total)	2
	Acortamiento de laminillas secundarias	2
	Alteración estructural	3
	<b>Cambios Progresivos</b>	Hipertrofia de células pavimentosas

Tabla 6: Valor del factor de importancia (W) asignado a cada alteración histológica observadas en hígado.

PATRÓN DE REACCIÓN	ALTERACIONES HISTOLÓGICAS	W
<b>Disturbios Circulatorios</b>	Dilatación de sinusoides	1
	Congestión vascular	1
	Hemólisis vascular	1
<b>Cambios Regresivos</b>	Degeneración hidrópica	1
	Metamorfosis grasa	2
	Necrosis	3
<b>Inflamación</b>	Infiltración leucocitaria	2

Por último, a cada daño patológico se le asigna un Valor de Ocurrencia (a), que adopta valores de 0 a 8 dependiendo del grado y extensión del daño, expresado en porcentaje (Rautenberg *et al.*, 2014) (Tabla 7).

De esta manera se calcularon para cada individuo los siguientes índices propuestos por Bernet *et al.* (1999):

1. Índice Histopatológico de Reacción de un Órgano ( $IH_{Org,Pr}$ ): Indica qué tipo de alteración predomina en el órgano y permite comparar cuánto daño produce cada patrón de reacción en la salud de órgano.
2. Índice Histopatológico por Órgano ( $IH_{Org}$ ): Determina el grado de alteración que presenta cada órgano por separado.
3. Índice Histopatológico Integral ( $IH_I$ ): Agrupa las alteraciones de los órganos estudiados para determinar la magnitud de daño en el organismo. Es una medida de salud general basada en lesiones histológicas.

Referencias	Valores de "a"(y % de daño en el órgano)				
	0	2	4	6	8
w					
1	0 al 5%	5,1 al 25%	25,1 al 50%	50,1 al 75%	> 75%
2	0 al 5%	5,1 al 15%	15,1 al 25%	25,1 al 50%	> 50%
3	0 al 5%	5,1 al 10%	10,1 al 20%	20,1 al 30%	> 30%

Tabla 7: Valor de ocurrencia (a) en función del porcentaje de extensión del daño y del peso de dicha alteración (w)

Para el análisis morfométrico en branquias, se consideraron las siguientes medidas: longitud y ancho de cada una de las laminillas secundarias (LLS y ALS), la distancia entre las mismas (DI) y el ancho del epitelio basal (AEB). Para el ALS, se tomó la medida en el primer cuarto de la laminilla secundaria, a fin de reducir errores por torsión del extremo distal de laminillas. Con el mismo objetivo, la medida de la distancia entre las laminillas fue tomada a la altura de la base de las laminillas secundarias. Para estimar el AEB se tomaron ocho medidas (entre cada laminilla secundaria analizada) y luego se realizó un promedio (Fig. 5). Los datos fueron obtenidos a través de la medición sobre imágenes digitales utilizando para ello el Software Image J. Además, se calculó el porcentaje de laminillas secundarias disponible para el intercambio gaseoso (%DIG) usando la ecuación propuesta por Nero *et al.* (2006b):

$$\%DIG = 100 \times [\text{media LLS} / (\text{media AEB} + \text{media LLS})]$$

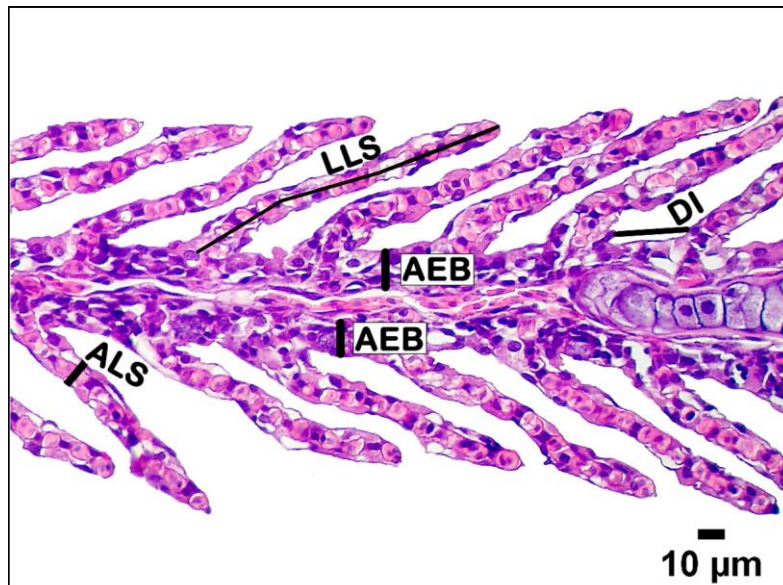


Fig. 5: Variables morfométricas medidas en branquias. ALS: Ancho de laminilla secundaria. LLS: Longitud de laminilla secundaria. DLS: Distancia entre laminillas secundarias. AEB: Ancho del epitelio basal.

### 3.3. Análisis estadísticos

Las diferencias estadísticas entre los sitios de muestreo para los diferentes biomarcadores fueron evaluadas, de acuerdo al comportamiento de los datos, a través de ANOVA o del Test no paramétrico Kruskal-Wallis. Como test a posteriori se utilizó el test de Tukey. En el caso del análisis morfométrico, las diferencias entre sitios fueron evaluadas a través de modelos mixtos. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

Para evaluar si existe relación entre la calidad del ambiente terrestre y los biomarcadores medidos se realizó un Análisis de Componentes Principales utilizando como variable aquellos biomarcadores que presentaron diferencias significativas entre sitios y como criterio de clasificación los índices IUT y CR. Se utilizó para todos los análisis, el Software INFOSAT (Di Rienzo *et al.*, 2016).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Calidad del ambiente terrestre

#### 4.1.1. A nivel regional: Calidad en el uso de la tierra

Los datos obtenidos del Índice de Uso de la Tierra (IUT) en cada sitio mostraron una disminución del valor IUT en sentido del flujo del agua, siendo el área analizada en La Bolsa la que presentó mejor calidad en el uso de la tierra y Pilar el área con menor IUT (Fig. 6). Los puntajes obtenidos para los indicadores del IUT, en cada sitio muestreado se resumen en la Tabla 8.

Por otra parte, el análisis de la pendiente del terreno en el área de 5 km de radio para cada sitio muestreado arrojó que las pendientes promedio (pp) fueron, en general, bajas. Los valores obtenidos fueron: La Bolsa,  $0,85^\circ$ , Despeñaderos,  $0,62^\circ$  y Pilar con un valor de  $0,16^\circ$ .

Tabla 8: Porcentajes y puntajes obtenidos para cada indicador del Índice de Uso de la Tierra, en los sitios muestreados.

Indicador \ Sitio	LA BOLSA		DESPEÑADEROS		PILAR	
	%	PUNTAJE	%	PUNTAJE	%	PUNTAJE
Cultivos	21,39	20	75,73	10	59,87	10
Construcciones	14,84	20	3,39	30	14,17	20
Cob. Vegetal	52,65	30	10,23	15	7,88	0
Cuerpos de agua	0,65	-	0,82	-	0,81	-
Otros	10,47	-	9,83	-	17,27	-



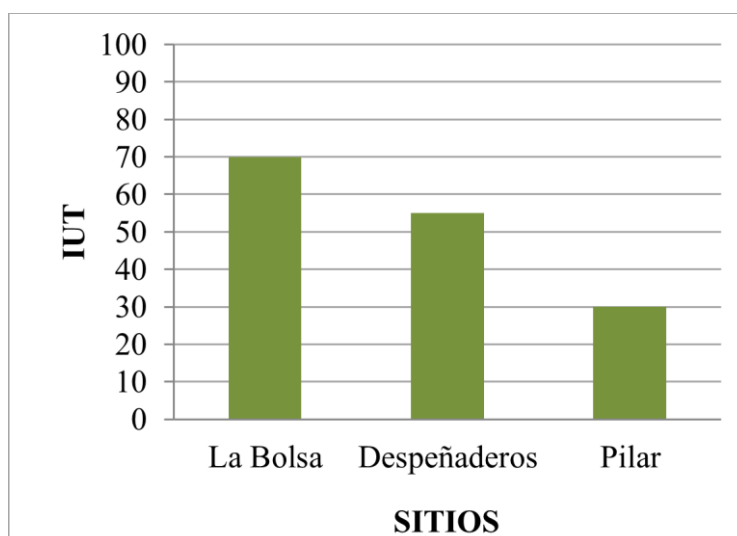


Fig. 6: Valor del Índice de Uso de la Tierra (IUT) para cada sitio muestreado.

#### 4.1.2. A nivel local: Calidad de ribera

Los resultados obtenidos en la evaluación de la calidad de ribera (CR) revelaron que Despeñaderos fue el sitio de peor calidad, donde la ribera fue valorada como mala (CR=45). En La Bolsa, la ribera fue valorada como muy buena ya que se obtuvo un valor elevado del índice (CR=95) siendo el sitio de mejor calidad. Aunque con un valor de CR un poco menor, el índice obtenido en Pilar (CR=80) demostró una buena calidad de la ribera (Fig. 7). Los puntajes obtenidos para los indicadores de CR, en ambas riberas de cada sitio muestreado, se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9: Puntajes obtenidos para los indicadores de Calidad de Ribera, en cada sitio muestreado. Ribera derecha (Rib. Der.), ribera izquierda (Rib. Izq.).

Sitio / Indicador	LA BOLSA		DESPEÑADEROS		PILAR	
	Rib. Der.	Rib. Izq.	Rib. Der.	Rib. Izq.	Rib. Der.	Rib. Izq.
<b>Cobertura Vegetal</b>	25	25	20	15	20	25
<b>Naturalidad del canal</b>	25	20	5	5	25	10

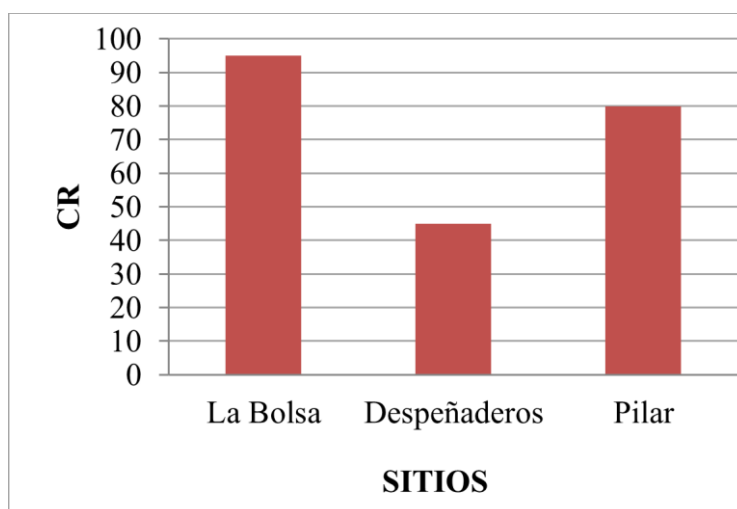


Fig. 7: Valor del índice de Calidad de Ribera (CR) para cada sitio muestreado

#### 4.2. Calidad del agua

Los valores obtenidos para las variables físicas, químicas y biológicas de cada sitio muestreado se resumen en la Tabla 10. A partir de estos valores se calcularon los ICAs (objetivo y subjetivo) para cada lugar. En cuanto al  $ICA_{obj}$ , se obtuvieron valores para los tres sitios entre 88 y 92. Por su parte, el  $ICA_{sub}$  revela que no hubo cambios respecto al  $ICA_{obj}$  para La Bolsa y Despeñaderos, mientras que en Pilar el  $ICA_{sub}$  fue menor que el objetivo (Fig. 8).

A partir del análisis de plaguicidas presentes en el río se determinó que, de los 27 plaguicidas evaluados, 19 fueron encontrados en la cuenca del río Xanaes. Despeñaderos fue el lugar que presentó las mayores concentraciones de la suma total de plaguicidas, siendo 2,6 veces mayor que en La Bolsa y 2,3 veces mayor que en Pilar (Tabla 11).

SITIO	T° del Agua	DBO	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ca	Cl	OD	Dureza	Mg	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	SD	ST	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Colif. TOT
	°C	mgO <sub>2</sub> /L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L CaCO <sub>3</sub>	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	NMP/100mL
<b>LB</b>	18	1,6	0,25	80,5	11,9	11,1	102,5	5,3	0,44	0,000	158	153,2	7,6	93,3
<b>D</b>	22	1,0	0,35	87,8	11,9	12,2	109,8	5,3	0,69	0,005	208	204,8	38,9	8,8
<b>P</b>	24	0,3	0,21	80,5	9,9	9,1	129,3	11,8	0,42	0,000	201	208,8	41,2	240,0

Tabla 10: Parámetros físicos, químicos y bacteriológicos del agua en cada sitio de muestreo. LB=La Bolsa; D=Despeñaderos; P=Pilar; DBO=Demanda Bioquímica de Oxígeno (medida a los 5 días); NH<sub>4</sub><sup>+</sup>=Amoníaco; Ca=Calcio; OD= Oxígeno disuelto; Mg=Magnesio; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>=Nitratos; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>=Nitritos; SD=Sólidos Disueltos; ST=Sólidos Totales; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>=Sulfatos; Colif. TOT=Coliformes totales; NMP=Número más probable.

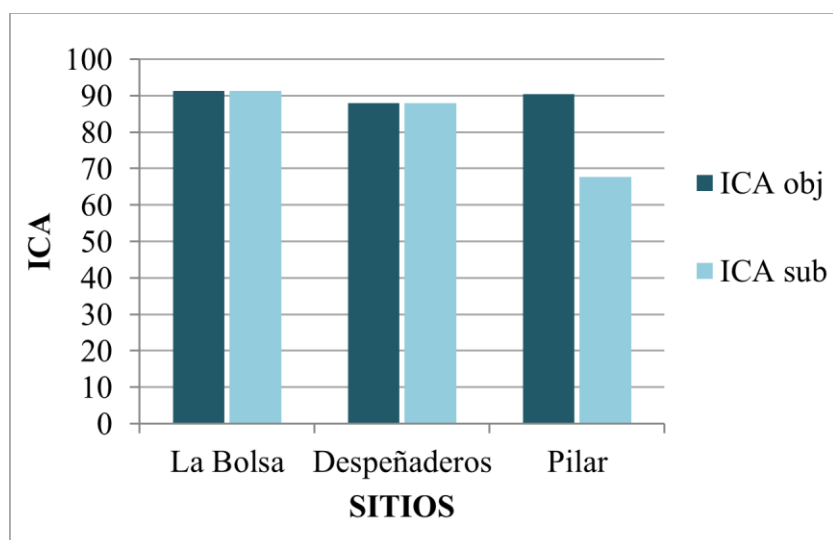


Fig. 8: Índice de Calidad de Agua objetivo (obj) y subjetivo (sub) para cada sitio de muestreo.

Tabla 11: Plaguicidas en muestras de agua de la cuenca del río Xanaes. Los valores representan la media  $\pm$  DS (ng/L). LQ=0,6-1,1 ng/L. LD=0,2-0,5 ng/L.

	La Bolsa	Despeñaderos	Pilar
<b>4,4'-DDD</b>	< LD	< LD	< LD
<b>4,4'-DDE</b>	<LQ	1,6 $\pm$ 0,1	<LD
<b>4,4'-DDT</b>	< LD	< LD	< LD
<b>Aldrin</b>	< LD	< LD	< LD
<b>Dieldrin</b>	1,9 $\pm$ 1,8	<LD	<LQ
<b>Endrin</b>	5,2 $\pm$ 3,0	18,6 $\pm$ 0,9	<LD
<b>alfa-clordane</b>	<LQ	<LQ	<LD
<b>g-Chlordane</b>	<LQ	<LQ	<LD
<b>alfa-Hexachlorocyclohexane</b>	3,6 $\pm$ 1,8	2,1 $\pm$ 0,8	<LQ
<b>d-Hexachlorocyclohexane</b>	<LQ	<LQ	<LQ
<b>g-Hexachlorocyclohexane</b>	<LD	<LD	81,0 $\pm$ 6,1
<b>Chlorbenzilate</b>	< LD	< LD	< LD
<b>Chloroneb</b>	< LD	68,3 $\pm$ 2,5	77,7 $\pm$ 9,3
<b>Chlorothalonil</b>	<LQ	<LQ	<LQ
<b>Chlorpyrifos</b>	<LD	<LD	8,4 $\pm$ 0,4
<b>DCPA-</b> <b>Dimethyltetrachloroterephthalate</b>	106,4 $\pm$ 12,5	301,8 $\pm$ 15,1	6,5 $\pm$ 7,3
<b>cis-Permethrin</b>	34,8 $\pm$ 16,2	36,9 $\pm$ 1,8	<LD
<b>trans-Permethrin</b>	< LD	< LD	< LD
<b>Endosulfán</b>	28,3 $\pm$ 1,3	3,5 $\pm$ 4,6	21,7 $\pm$ 12,5
<b>Endosulfán II</b>	5,9 $\pm$ 0,0	18,6 $\pm$ 19,9	2,1 $\pm$ 0,1
<b>Endosulfan Sulfate</b>	<LD	6,9 $\pm$ 0,3	<LD
<b>HCB- Hexachlorobenzene</b>	1,6 $\pm$ 0,7	9,9 $\pm$ 8,9	0,8 $\pm$ 0,5
<b>Heptachlor</b>	<LQ	<LQ	5,7 $\pm$ 6,4
<b>HeptachlorEpoxide</b>	<LQ	<LQ	<LD
<b>Methoxychlor</b>	< LD	< LD	< LD
<b>Propachlor</b>	< LD	< LD	< LD
<b>Trifluralin</b>	< LD	< LD	< LD
<b><math>\Sigma</math> Plaguicidas</b>	<b>187,7<math>\pm</math>29,6</b>	<b>468,2<math>\pm</math>25,8</b>	<b>204,0<math>\pm</math>11,0</b>

### 4.3. Biomarcadores

#### 4.3.1. Estado general de los peces

Los resultados de los índices somáticos revelaron que tanto el Factor de Condición (FC) como el Índice Hepatosomático (IHS) presentaron valores significativamente más elevados en los individuos de La Bolsa (FC=0,78±0,05 y IHS=1,43±0,12) que en los de Despeñaderos (FC=0,65±0,03 y IHS=0,89±0,09) (Fig. 9 y 10). En el sitio Pilar no se encontraron diferencias significativas con los individuos de La Bolsa ni con los de Despeñaderos, para ambos índices.

Por su parte, el estudio del consumo de reservas energéticas en hígado reveló que el contenido de glucógeno fue significativamente mayor en los individuos de La Bolsa con respecto a Despeñaderos, mientras que en Pilar no se observaron diferencias significativas con los peces de los otros dos sitios. El contenido de lípidos arrojó un mayor valor en los individuos de La Bolsa, con respecto a Pilar y Despeñaderos. No existieron diferencias significativas entre los sitios de muestreo para el consumo de proteínas hepáticas (Tabla 12).

Por otro lado, el análisis del consumo de reservas energéticas en músculo evidenció que sólo para los lípidos existieron diferencias significativas entre sitios, siendo los individuos de La Bolsa los que presentaron un contenido de triglicéridos significativamente mayor que en los otros dos sitios. El contenido de glucógeno y proteínas musculares no reflejan diferencias significativas entre los sitios (Tabla 12).

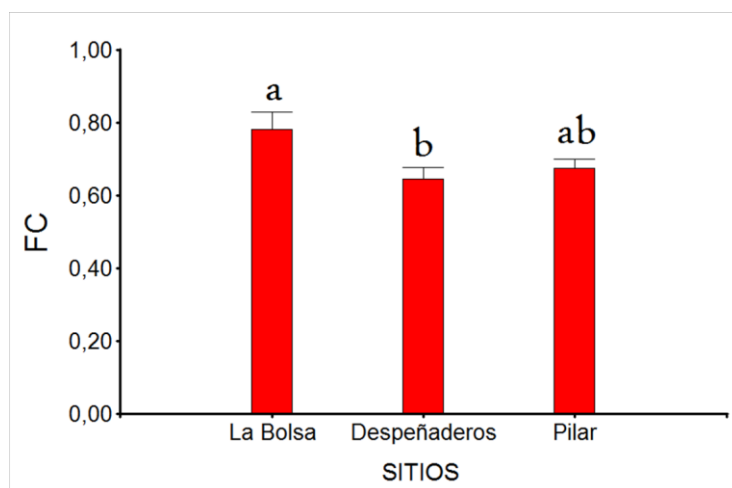


Fig. 9: Factor de Condición (FC) para cada sitio de muestreo N=62. Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitio (p<0,05).

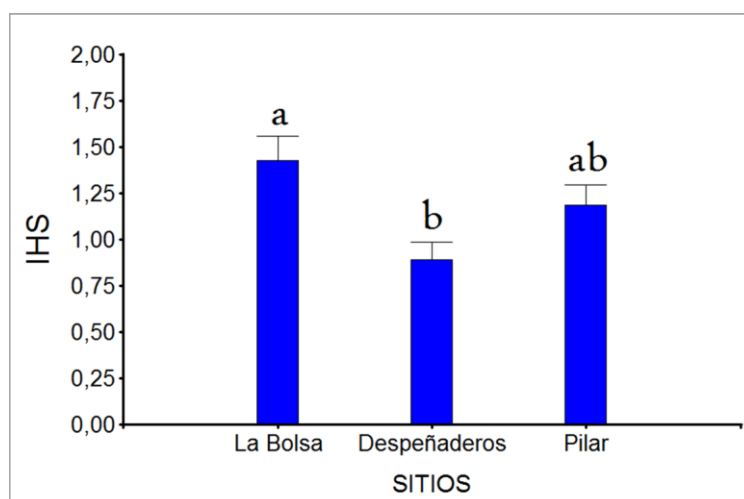


Fig. 10: Índice Hepatosomático (IHS) para cada sitio de muestreo N=62. Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ( $p < 0,05$ ).

Tabla 12: Parámetros energéticos de los tejidos (hígado y músculo) en *Heptapterus mustelinus* de los diferentes sitios de muestreo. Los valores representan las medias con el error estándar (EE). Medidas con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

	La Bolsa	Despeñaderos	Pilar
<b>HÍGADO</b>			
Glucógeno ( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{th}$ )	51,14±16,76 ( <b>b</b> )	3,53±1,57 ( <b>a</b> )	17,38±1,1 ( <b>ab</b> )
Lípidos ( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{th}$ )	19,03±1,03 ( <b>b</b> )	11,46±1,4 ( <b>a</b> )	12,82±1,41 ( <b>a</b> )
Proteínas ( $\text{mg.g}^{-1}\text{th}$ )	265,48±14,59 ( <b>a</b> )	266,34±24,73 ( <b>a</b> )	216,03±18,9 ( <b>a</b> )
<b>MÚSCULO</b>			
Glucógeno ( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{th}$ )	1,53±0,46 ( <b>a</b> )	0,64±0,07 ( <b>a</b> )	1,00±0,23 ( <b>a</b> )
Lípidos ( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{th}$ )	20,01±2,57 ( <b>b</b> )	5,73±0,27 ( <b>a</b> )	4,93±0,66 ( <b>a</b> )
Proteínas ( $\text{mg.g}^{-1}\text{th}$ )	126,27±24,15 ( <b>a</b> )	88,44±17,86 ( <b>a</b> )	98,46±20,83 ( <b>a</b> )

#### 4.3.2. Biomarcadores enzimáticos e indicadores de estrés oxidativo

Los valores obtenidos de la actividad enzimática de GST, CAT y AchE, y el contenido de proteínas carboniladas, se resumen en la Tabla 13.

En cuanto a la actividad enzimática, la GST mostró sólo diferencias significativas en la fracción citosólica de las branquias, donde los peces de Pilar presentaron una actividad enzimática menor respecto a los individuos de La Bolsa y Despeñaderos. La actividad de la CAT no reveló diferencias significativas entre los individuos de los tres sitios, para ninguno de los órganos. Sin embargo, se observa una tendencia de disminución en branquias y cerebro en los peces de Despeñaderos y Pilar, respecto a valor obtenido para los organismos de La Bolsa. Por último, la actividad de AchE mostró diferencias significativas entre sitios sólo en

la fracción microsomal del músculo. Allí, los peces de Despeñaderos y Pilar presentaron la actividad enzimática disminuida, siendo significativamente menor de lo registrado en los individuos de La Bolsa.

En cuanto al contenido de Proteínas Carboniladas en músculo, no se observaron diferencias significativas entre los individuos de cada sitio.

Tabla 13: Actividad enzimática y contenido de proteínas en diferentes órganos de *H. mustelinus* según sitios de muestreo. Media  $\pm$  EE (nkat/mg prot). Medidas con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). GST<sub>cito</sub>: Glutación-s-transferasa citosólica. GST<sub>micro</sub>: Glutación-s-transferasa microsomal. CAT<sub>cito</sub>: Catalasa citosólica. AchE<sub>cito</sub>: Acetilcolinesterasa citosólica. AchE<sub>micro</sub>: Acetilcolinesterasa microsomal. ProtCarb: Proteínas carboniladas.

	LA BOLSA	DESPEÑADEROS	PILAR
<b>GST<sub>cito</sub></b>			
Músculo	0,2 $\pm$ 0,03 (a)	0,21 $\pm$ 0,01 (a)	0,21 $\pm$ 0,02 (a)
Branquias	1,44 $\pm$ 0,07 (b)	1,21 $\pm$ 0,1 (b)	0,89 $\pm$ 0,09 (a)
Hígado	3,54 $\pm$ 0,32 (a)	2,75 $\pm$ 0,4 (a)	2,75 $\pm$ 0,77 (a)
Cerebro	1,53 $\pm$ 0,22 (a)	1,4 $\pm$ 0,09 (a)	1,39 $\pm$ 0,11 (a)
<b>GST<sub>micro</sub></b>			
Músculo	0,17 $\pm$ 0,09 (a)	0,13 $\pm$ 0,03 (a)	0,12 $\pm$ 0,02 (a)
Branquias	0,87 $\pm$ 0,19 (a)	0,85 $\pm$ 0,07 (a)	0,44 $\pm$ 0,05 (a)
Hígado	1,18 $\pm$ 0,16 (a)	0,9 $\pm$ 0,22 (a)	0,83 $\pm$ 0,24 (a)
Cerebro	0,57 $\pm$ 0,06 (a)	0,38 $\pm$ 0,06 (a)	0,42 $\pm$ 0,08 (a)
<b>CAT<sub>cito</sub></b>			
Músculo	3,68 $\pm$ 0,58 (a)	3,24 $\pm$ 0,57 (a)	2,99 $\pm$ 0,5 (a)
Branquias	18,12 $\pm$ 3,45 (a)	10,35 $\pm$ 1,88 (a)	9,43 $\pm$ 1,19 (a)
Cerebro	57,7 $\pm$ 24,8 (a)	24,88 $\pm$ 1,88 (a)	32,44 $\pm$ 4,18 (a)
<b>AchE<sub>cito</sub></b>			
Músculo	6,5E-4 $\pm$ 1,5E-4 (a)	5,2E-4 $\pm$ 5,2E-4 (a)	5,9E-4 $\pm$ 1,3E-4 (a)
Hígado	2,4E-3 $\pm$ 4,5E-4 (a)	1,9E-3 $\pm$ 1,1E-3 (a)	2,3E-3 $\pm$ 1E-3 (a)
Cerebro	0,02 $\pm$ 0,01 (a)	0,01 $\pm$ 8,4E-4 (a)	0,01 $\pm$ 8,3E-4 (a)
<b>AchE<sub>micro</sub></b>			
Músculo	0,01 $\pm$ 2,4E-3 (b)	2,2E-3 $\pm$ 1,8E-4 (a)	2,8E-3 $\pm$ 8,9E-4 (a)
Hígado	2,6E-3 $\pm$ 3,7E-4 (a)	2E-3 $\pm$ 1,2E-3 (a)	3,7E-3 $\pm$ 1,6E-3 (a)
Cerebro	0,02 $\pm$ 0,01 (a)	0,01 $\pm$ 1,8E-3 (a)	0,01 $\pm$ 1,5E-3 (a)
<b>ProtCarb</b>			
Músculo	5,24 $\pm$ 0,4 (a)	4,62 $\pm$ 0,45 (a)	5,51 $\pm$ 0,14 (a)

### Respuestas de Biomarcadores Integrados

El índice RBI para *H. mustelinus* fue calculado a partir de los biomarcadores de condición general del pez y los biomarcadores moleculares que reflejaron diferencias significativas entre sitios: Factor de Condición, Índice Hepatosomático, contenido de glucógeno en hígado,

contenido de lípidos en hígado, contenido de lípidos en músculo, GST<sub>cito</sub> en Branquias, AchE<sub>micro</sub> en músculo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11, donde el área del gráfico de estrella integra el RBI para cada sitio muestreado. Los valores obtenidos para cada sitio fueron significativamente diferentes entre sí, obteniendo Despeñaderos el mayor valor del índice (Tabla 14).

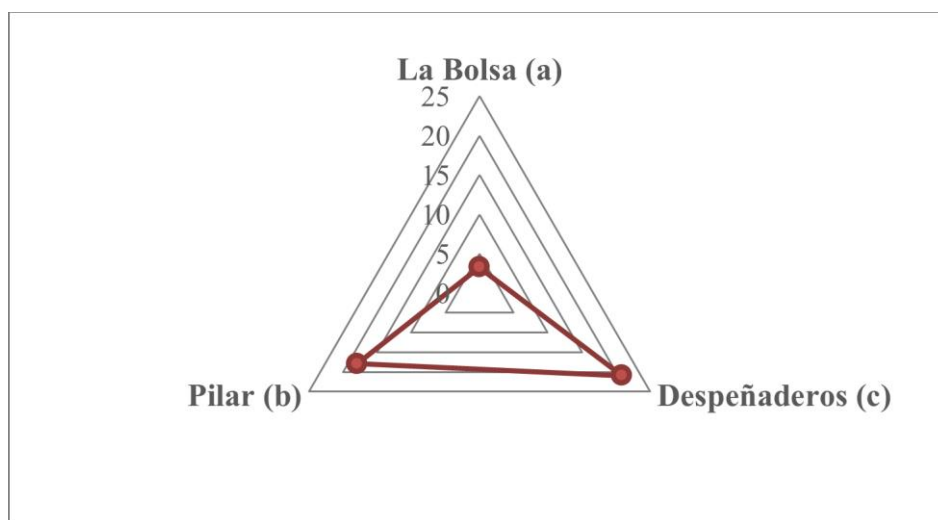


Fig. 11: Respuestas de biomarcadores integrados (RBI) obtenido en cada sitio de muestreo.

Tabla 14: Valores de RBI obtenidos para *H. mustelinus* en cada sitio de muestreo. Media  $\pm$  EE. Medidas con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

SITIOS	RBI
<b>La Bolsa</b>	3,26 $\pm$ 0,12 (a)
<b>Despeñaderos</b>	20,89 $\pm$ 0,17 (c)
<b>Pilar</b>	17,91 $\pm$ 0,07 (b)

#### 4.3.3. Análisis histológicos

##### **Branquias**

La histomorfología de las branquias analizadas en *H. mustelinus* respondió al patrón general de los peces teleósteos: arco branquial con eje cartilaginoso, laminillas primarias y secundarias (Fig. 12A). Estas últimas están cubiertas por distintos tipos de células que forman un epitelio simple plano, denominado epitelio respiratorio. El principal tipo celular que se encuentra en este epitelio son las llamadas células pavimentosas. En la base del epitelio de las



laminillas secundarias, y en el espacio interlamelar, se ubican las células de cloro (acidófilas) y las células mucosas (basófilas), parcialmente recubiertas por células pavimentosas. Internamente, las laminillas secundarias están compuestas por células de soporte o células pilares.

Las branquias de los individuos de cada sitio de muestreo presentaron, en mayor o menor medida, alteraciones asociadas a diferentes patrones de reacción (Fig. 12 B-F). Hubo una gran prevalencia de hipertrofia de células pavimentosas y de lifting de células pavimentosas, correspondientes al patrón de reacción cambios progresivos y cambios regresivos respectivamente. No se registraron alteraciones inflamatorias (Fig. 13).

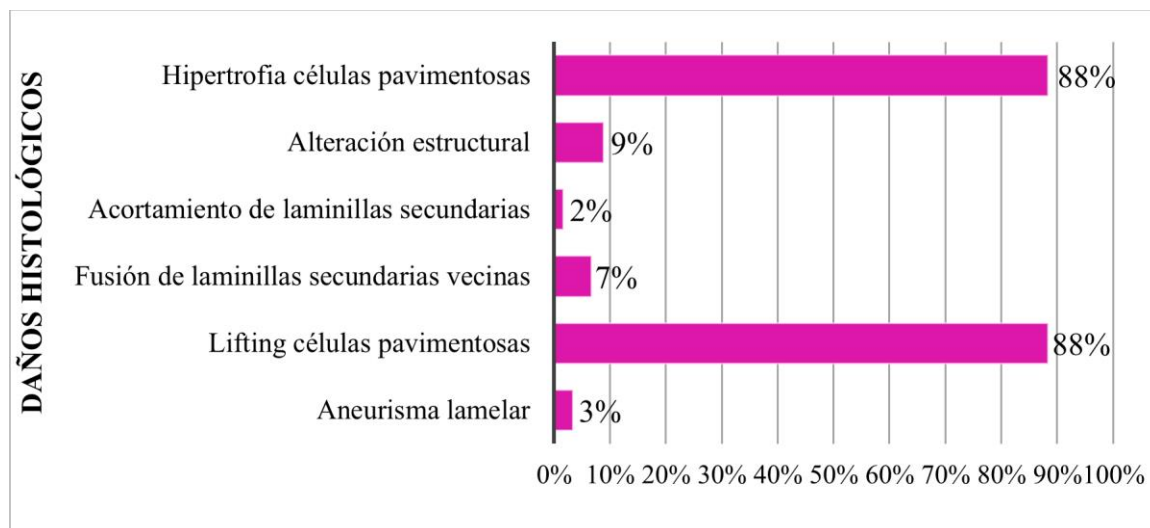


Fig. 13: Porcentaje de prevalencia de daños histológicos en branquias en el total de las muestras analizadas.

Del análisis histológico de las branquias teniendo en cuenta cada sitio de muestreo, se desprende que el daño fusión de laminillas secundarias (Fig. 12C) fue significativamente mayor en los individuos de Despeñaderos que en los de La Bolsa. El resto de las alteraciones no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios, pero se observa una tendencia de aumento en alteraciones estructurales (Fig. 12F) y lifting de células pavimentosas (Fig. 12D) en los ejemplares de Despeñaderos y Pilar. Cabe destacar que el acortamiento de laminillas secundarias sólo fue registrado en los peces de Despeñaderos, aunque en muy bajo porcentaje (1,2%). No se evidenció diferencia significativa entre sitios para los aneurismas (Fig. 12E), pero la frecuencia de encuentro fue en total sólo del 3%. La prevalencia de los daños para cada sitio se resume en las Fig. 14 y 15.

Respecto al número de células de cloro contabilizadas en los individuos de *H. mustelinus*, se evidenció un aumento significativo de las mismas en ejemplares de Despeñaderos en

relación a los de La Bolsa. En el recuento de células mucosas no existieron diferencias significativas entre los sitios muestreados (Tabla 15).

Por otra parte, se observó en muy baja frecuencia la presencia de epitelocistis en las laminillas secundarias. Estos quistes aparecieron únicamente en individuos de Despeñaderos y de Pilar (Fig. 16).

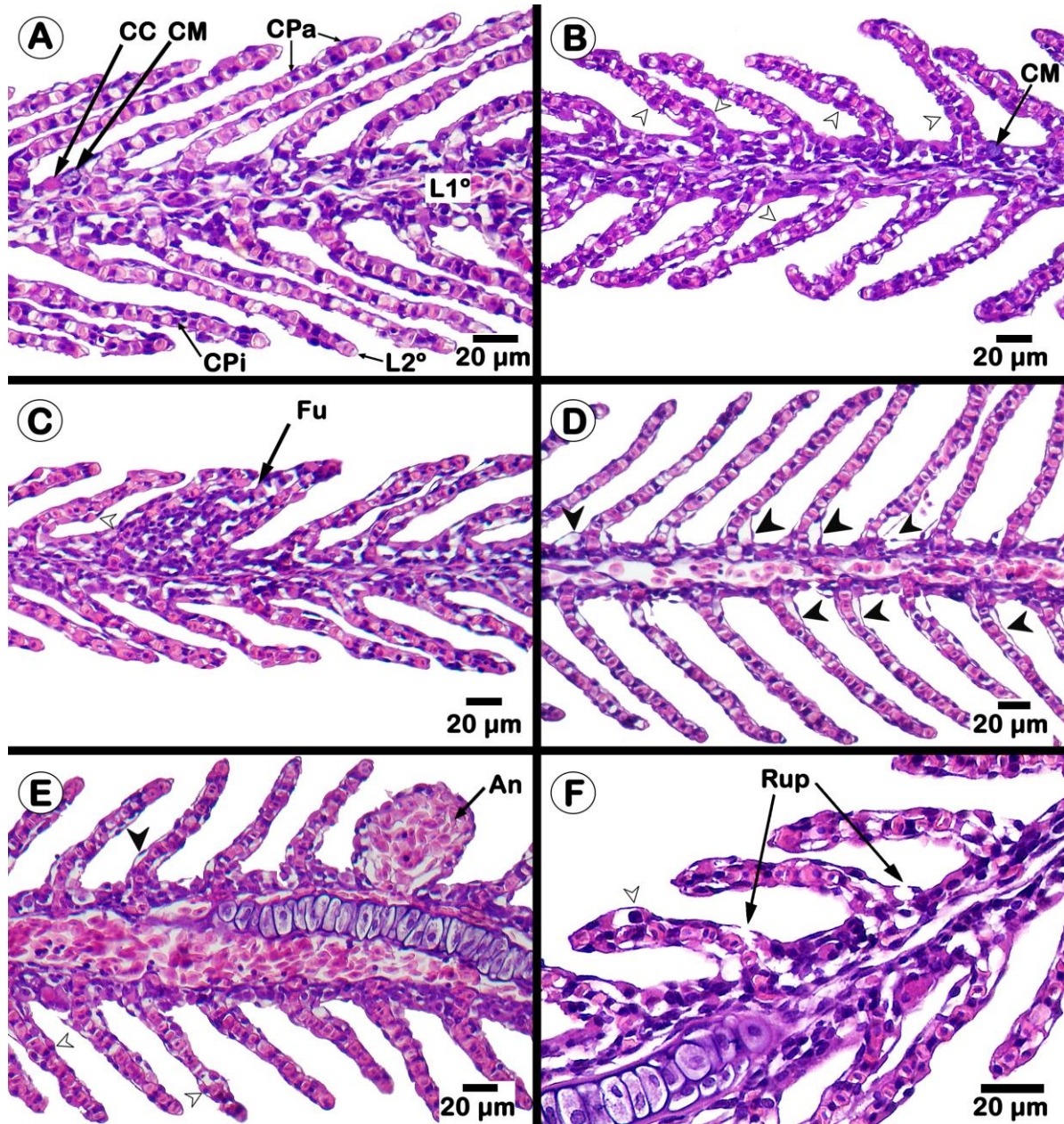


Fig. 12: Daños registrados en branquias de *H. mustelinus*. (A) Aspecto normal de la branquia, se observa laminilla primaria (L1°), laminillas secundarias (L2°), células de cloro (CC), células mucosas (CM), células pavimentosas (CPa) y células pilares (CPi). (B) Laminillas secundarias con gran cantidad de células pavimentosas hipertrofiadas (punta de flecha  $\Delta$ ). (C) Fusión de 2 laminillas secundarias (Fu). (D) Laminillas secundarias con lifting epitelial (punta de flecha  $\blacktriangleleft$ ). (E) Aneurisma lamelar (An). (F) Alteración estructural en epitelio branquial (Rup: ruptura del epitelio).

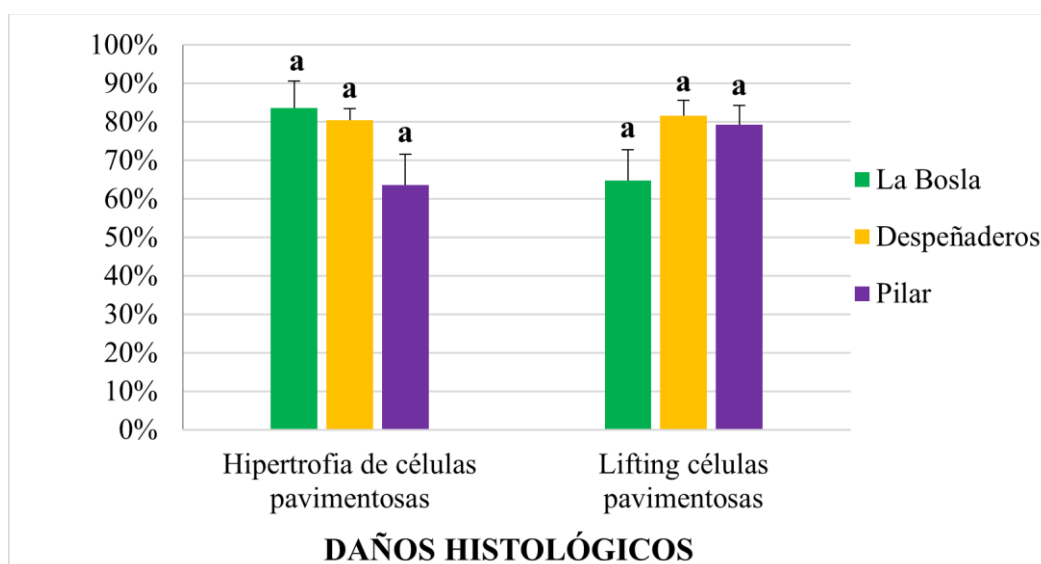


Fig. 14: Porcentaje de los daños histológicos más frecuentes observados en branquias, para cada sitio muestreado. Media  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

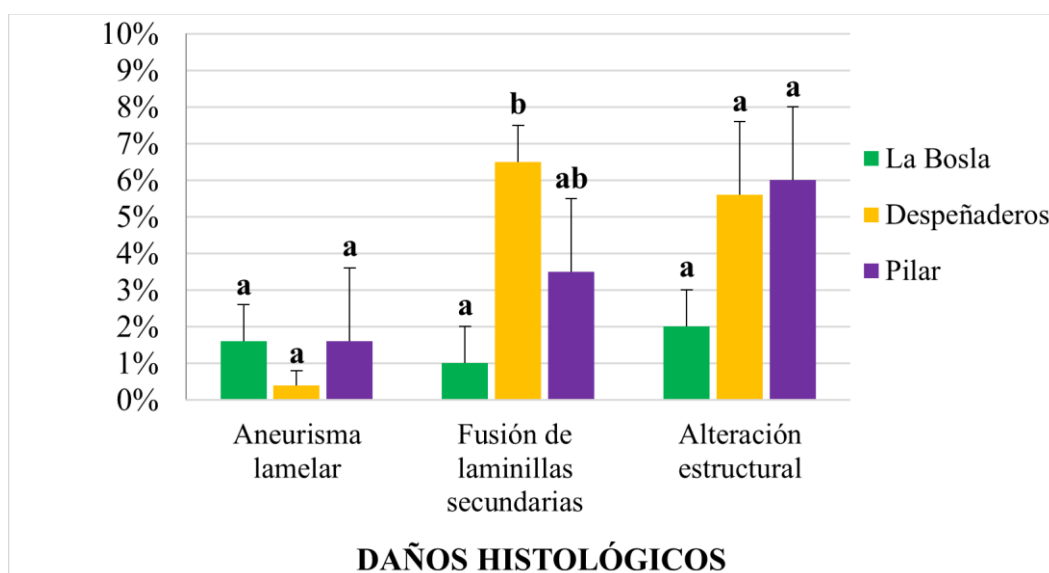


Fig. 15: Porcentaje de daños histológicos observados en branquias, para cada sitio muestreado. Media  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabla 15: Número de células de cloro y células mucosas. Los valores representan las medias  $\pm$  EE. Medidas con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los sitios de muestreo.

	La Bolsa	Despeñaderos	Pilar
<b>Células de Cloro</b>	4,56 $\pm$ 0,52 (a)	7,4 $\pm$ 0,96 (b)	5,76 $\pm$ 0,53 (ab)
<b>Células Mucosas</b>	1,48 $\pm$ 0,45 (a)	0,6 $\pm$ 0,23 (a)	0,76 $\pm$ 0,28 (a)

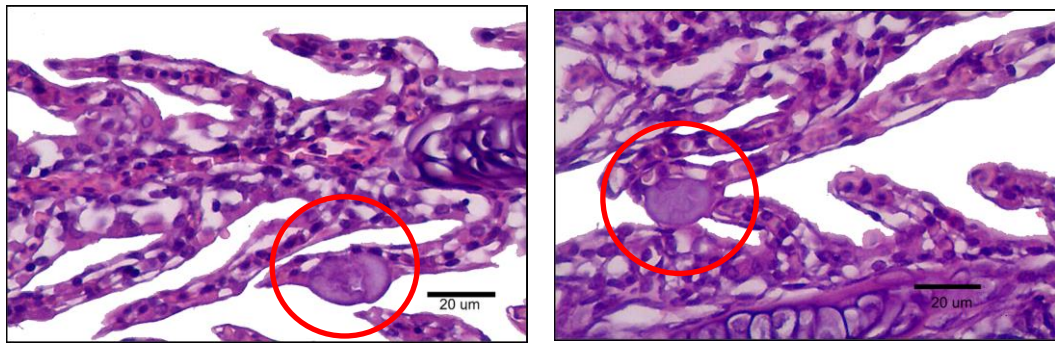


Fig. 16: Epiteliocistis en laminillas secundarias. En la figura se observan los quistes (círculo rojo).

### **Hígado**

Los hígados de todos los peces analizados presentaron un parénquima de estructura hepatocito-sinusoidal sólido, con hepatocitos de forma poliédrica y sinusoides tortuosos, estrechos y cortos. (Fig. 17A).

Se observaron alteraciones en los sitios muestreados asociadas a los patrones de reacción: disturbios circulatorios (pr1), cambios regresivos (pr2) e inflamación (pr4). No se registraron daños asociados a cambios progresivos (pr3) (Fig.17 B-H). La prevalencia de las alteraciones histológicas observadas en el hígado fue en general baja, presentando mayor porcentaje de ocurrencia los daños dilatación de sinusoides y degeneración hidrópica, seguidos por necrosis y congestión vascular (Fig. 18).

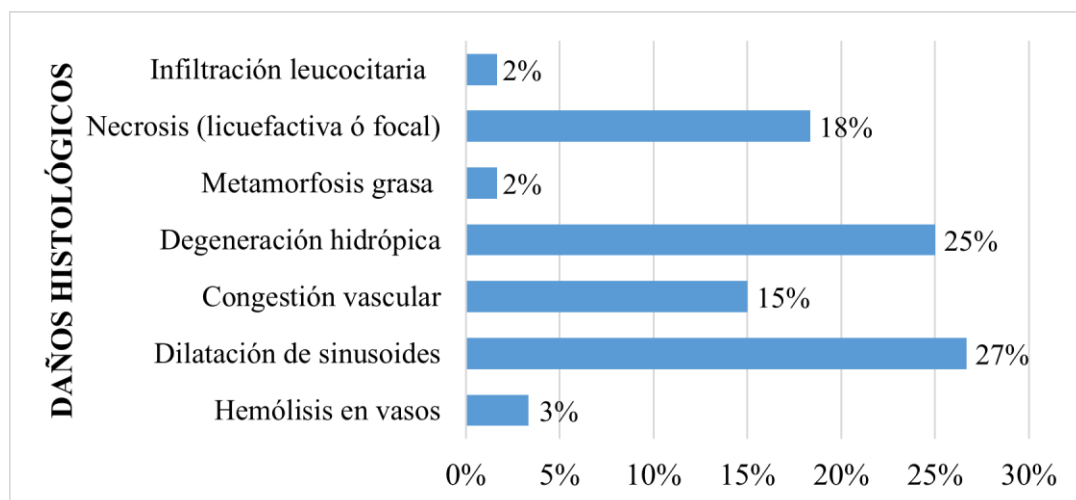


Fig. 18: Porcentaje de prevalencia de daños histológicos en hígado, en el total de las muestras analizadas.

Del análisis de daños por sitio de muestreo se observó que sólo existen diferencias significativas para la necrosis (Fig. 17G), siendo los individuos de Despeñaderos los que presentaron el mayor porcentaje. Se evidencia una tendencia al aumento en degeneración hidrópica en los ejemplares de Pilar (Fig. 17D). Es importante remarcar que la infiltración leucocitaria sólo fue observada en individuos de Despeñaderos, aunque en un porcentaje muy bajo (2%) (Fig. 17F). La prevalencia de los daños para cada sitio se resume en la Fig. 19.

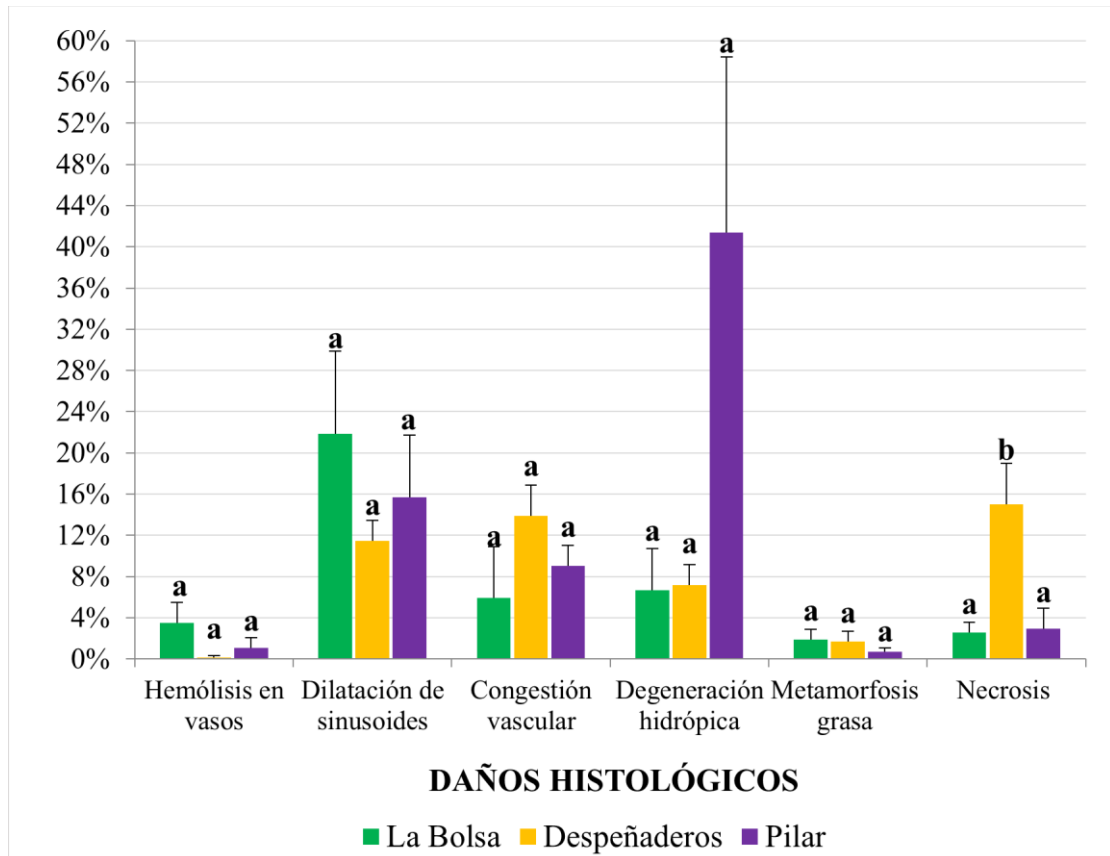


Fig. 19: Porcentaje de daños histológicos observados en hígado, para cada sitio muestreado. Media  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

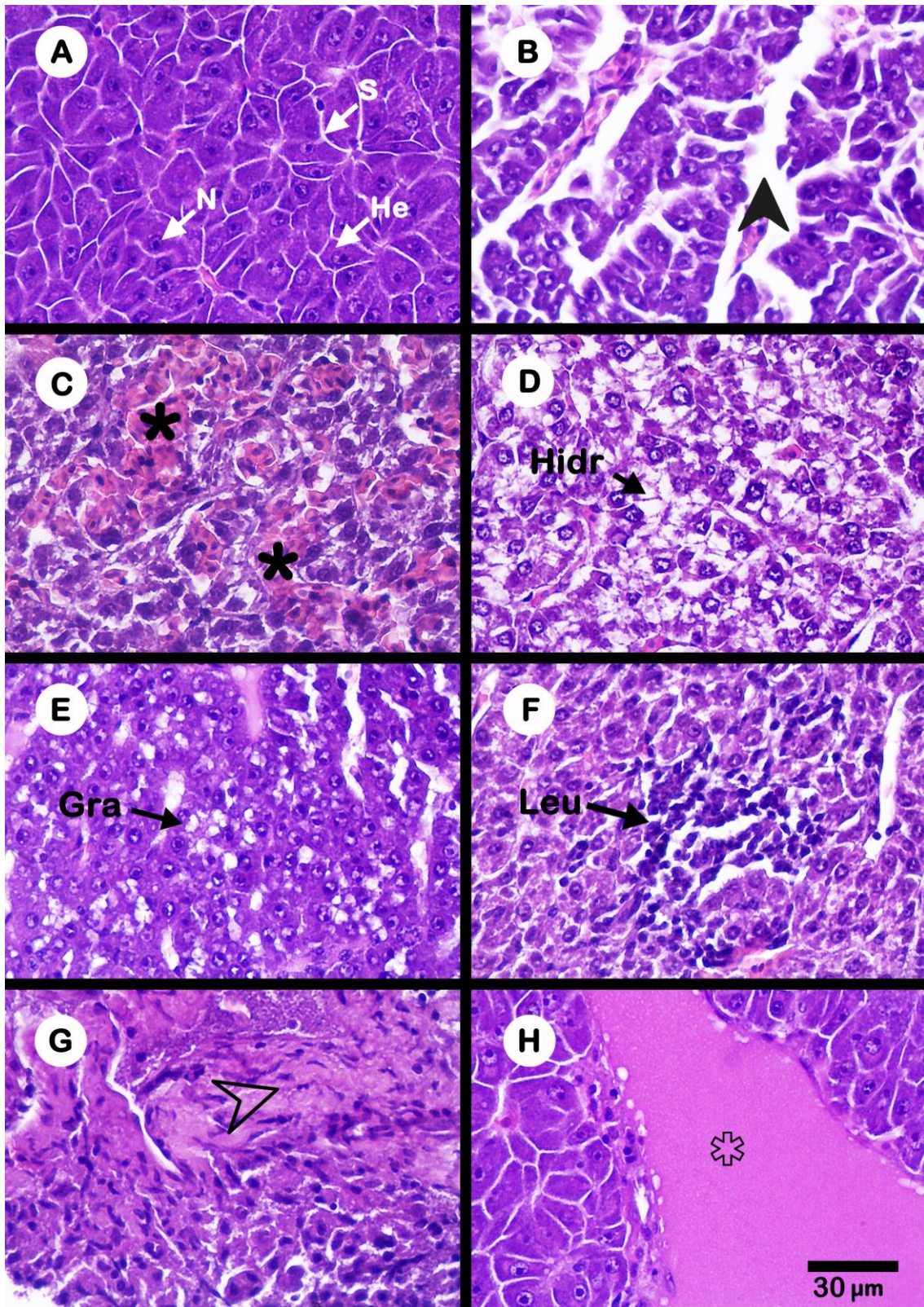


Fig. 17: Daños registrados en hígado de *H. mustelinus*. (A) Parénquima hepático normal con hepatocitos polihédricos (He) y núcleos basófilos (N), se observan sinusoides (S). (B) parénquima hepático con dilatación de sinusoides (punta de flecha ▲). (C) Congestión vascular (\*). (D) Degeneración hidrópica (DHid). (E) Metamorfosis grasa (Gra). (F) Infiltración leucocitaria (Leu). (G) Tejido hepático con un foco necrótico (punta de flecha Δ). (H) Vaso hepático con hemólisis (asterisco vacío).

#### 4.3.3.1. Índices Histopatológicos

##### **Branquias**

Los valores obtenidos para el Índice Histopatológico por patrón de reacción ( $IH_{pr}$ ) se observan en la Tabla 16. Las alteraciones inflamatorias ( $pr4$ ) estuvieron ausentes en todos los sitios y los disturbios circulatorios ( $pr1$ ) se registraron en muy baja frecuencia (sólo en un individuo de La Bolsa y en uno de Pilar). Para los cambios regresivos ( $pr2$ ), el  $IH_{pr2}$  arrojó un valor menor para los individuos de La Bolsa, diferenciándose significativamente del resto de los sitios. Por último, el índice de daños progresivos ( $IH_{pr3}$ ) no evidenció diferencias significativas entre sitios.

El análisis del Índice Histopatológico general para Branquias ( $IH_{Br}$ ) mostró que el valor obtenido para los ejemplares de La Bolsa fue significativamente menor que en Despeñaderos y Pilar, mientras que entre estos dos sitios no se observó diferencia significativa (Fig. 20).

Tabla 16: Índices Histopatológicos para diferentes patrones de reacción en branquias. Los valores representan las medias  $\pm$  EE. Medidas con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los sitios de muestreo.  $IH_{Bra.Pr2}$ : Índice histopatológico de branquias para patrón de reacción 2,  $IH_{Bra.Pr3}$ : Índice histopatológico de branquias para patrón de reacción 3.

	La Bolsa	Despeñaderos	Pilar
$IH_{Bra.Pr2}$	12,86 $\pm$ 0,87 (a)	23,57 $\pm$ 1,43 (b)	20 $\pm$ 0,87 (b)
$IH_{Bra.Pr3}$	90 $\pm$ 6,12 (a)	95 $\pm$ 5 (a)	80 $\pm$ 9,35 (a)

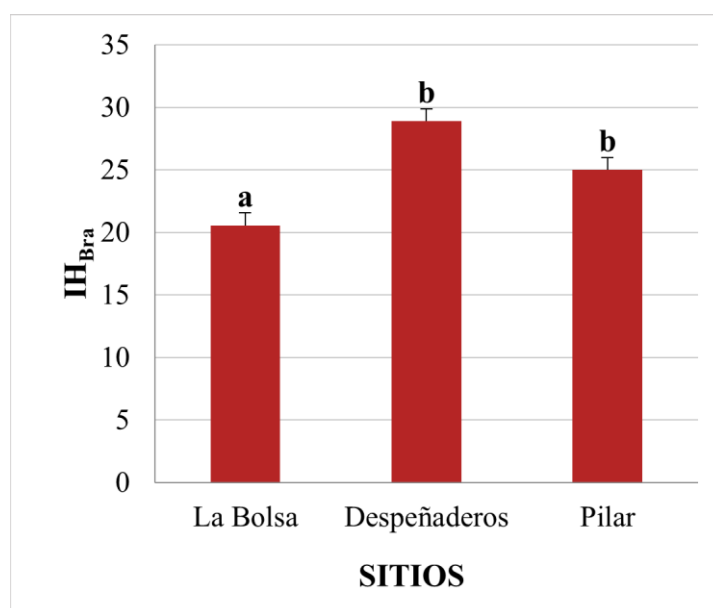


Fig. 20: Índice histopatológico de branquias, para cada sitio muestreado. Media  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## Hígado

El análisis de los Índices Histopatológicos por patrón de reacción ( $IH_{pr}$ ) en hígado de *H. mustelinus*, reveló que estuvieron ausentes los daños progresivos (pr3) y las alteraciones inflamatorias (pr4) se registraron en muy baja frecuencia (sólo un individuo de Despeñaderos). Para los disturbios circulatorios (pr1) y para los cambios regresivos (pr2), no existieron diferencias significativas entre los sitios. Sin embargo, se observa una tendencia de incremento de estos índices en Despeñaderos y Pilar, respecto a La Bolsa (Tabla 17).

El Índice Histopatológico general para hígado ( $IH_{Híg}$ ) evidenció que el valor obtenido para los peces de Despeñaderos fue significativamente mayor con respecto a los de La Bolsa. El  $IH_{Híg}$  obtenido para Pilar no mostró diferencias significativas con ninguno de los otros dos sitios (Fig. 21).

Tabla 17: Índices Histopatológicos para diferentes patrones de reacción en hígado. Los valores representan las medias  $\pm$  EE. Medidas con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los sitios de muestreo.  $IH_{Híg,Pr1}$ : Índice histopatológico de hígado para patrón de reacción 1,  $IH_{Híg,Pr2}$ : Índice histopatológico de hígado para patrón de reacción 2.

	La Bolsa	Despeñaderos	Pilar
$IH_{Híg,Pr1}$	13,33 $\pm$ 2,04 (a)	15 $\pm$ 1,67 (a)	16,67 $\pm$ 2,15 (a)
$IH_{Híg,Pr2}$	5,83 $\pm$ 2,12 (a)	25 $\pm$ 7,22 (a)	13,19 $\pm$ 4,62 (a)

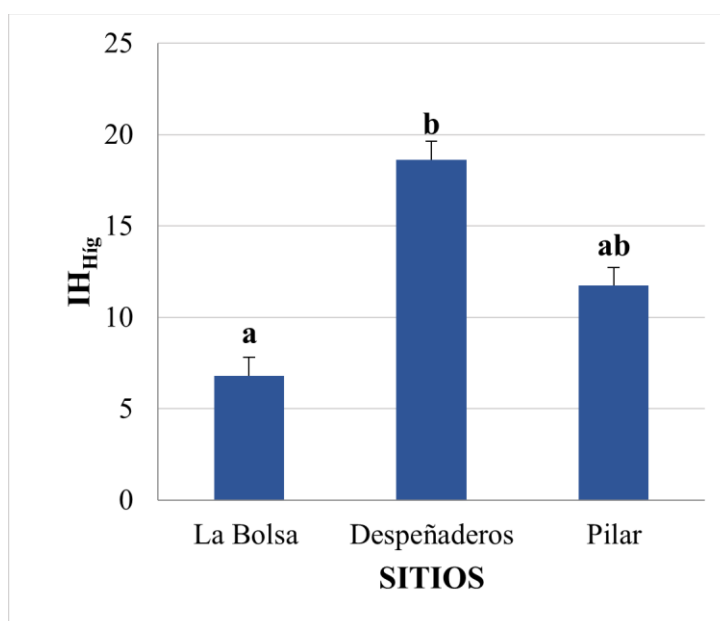


Fig. 21: Índice histopatológico de hígado, para cada sitio muestreado. Media  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



#### 4.3.3.2. Índice Integral

El cálculo del índice integral ( $IH_I$ ) arrojó valores que fueron significativamente diferentes entre los individuos de La Bolsa y Despeñaderos, siendo mayor en estos últimos. Para los ejemplares de Pilar se obtuvo un  $IH_I$  intermedio, sin diferir significativamente con ninguno de los otros dos sitios (Fig. 22).

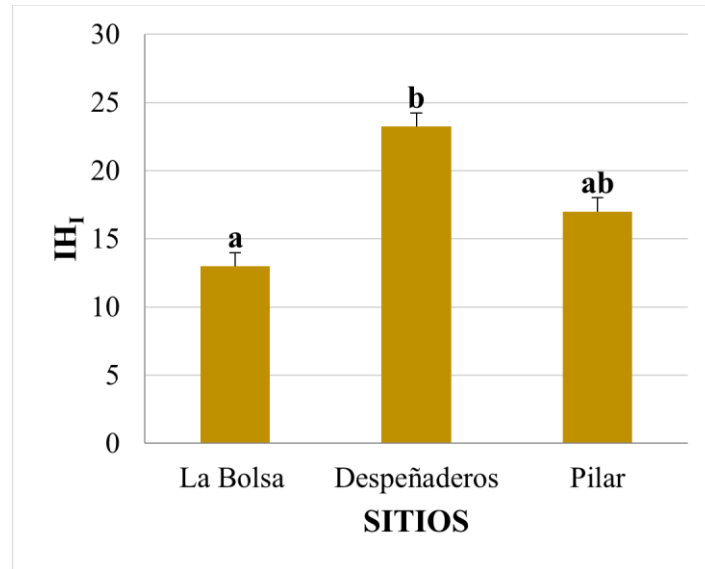


Fig. 22: Índice histopatológico integral ( $IH_I$ ), para cada sitio muestreado. Media  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3.3. Análisis morfométrico

Las variables registradas para el análisis morfométrico de branquias en *H. mustelinus* mostraron que tanto para el ancho como para la longitud de laminillas secundarias (ALS y LLS respectivamente) no existieron diferencias significativas entre los individuos de los sitios muestreados. Respecto al ancho del epitelio basal (AEB), los valores obtenidos para los peces de La Bolsa y Despeñaderos fueron significativamente mayores respecto al valor obtenido para Pilar. La distancia interlamelar (DI) mostró valores significativamente superiores en los ejemplares de Pilar respecto a los de Despeñaderos, mientras que el valor obtenido para los individuos de La Bolsa no mostró diferencias significativas con ninguno de los otros dos sitios.

Finalmente, el porcentaje de laminillas secundarias disponible para el intercambio gaseoso (%DIG) arrojó diferencias significativas para los peces de Pilar con respecto a los de Despeñaderos, siendo mayor en Pilar. Para los ejemplares de La Bolsa se obtuvo un

porcentaje intermedio, sin diferir significativamente con ninguno de los otros dos sitios (Tabla 18).

Tabla 18: Parámetros morfométricos. Los valores representan las medias  $\pm$  EE. Medidas con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los sitios de muestreo. ALS: ancho de laminilla secundaria, LLS: longitud de laminilla secundaria, AEB: ancho del epitelio basal, DI: distancia interlamelar, %DIG: porcentaje disponible para el intercambio gaseoso.

	La Bolsa	Despeñaderos	Pilar
<b>ALS</b>	62,51 $\pm$ 2,69 (a)	54,29 $\pm$ 2,42 (a)	51,1 $\pm$ 2,37 (a)
<b>LLS</b>	457,89 $\pm$ 14,85 (a)	420,29 $\pm$ 18,29 (a)	464,83 $\pm$ 20,13 (a)
<b>AEB</b>	122,56 $\pm$ 7,63 (a)	128,36 $\pm$ 9,03 (a)	89,37 $\pm$ 4,47 (b)
<b>DI</b>	90,08 $\pm$ 5,14 (ab)	78,59 $\pm$ 3,86 (b)	102,57 $\pm$ 3,55 (a)
<b>%DIG</b>	78,69 $\pm$ 1,33 (ab)	76,44 $\pm$ 2,21 (a)	83,92 $\pm$ 1,41 (b)

#### 4.4. Análisis de Componentes Principales

Para establecer relación entre la calidad del ambiente terrestre con los biomarcadores medidos en *H. mustelinus*, se realizó un ACP con las variables independientes que, en análisis previos, mostraron diferencias significativas entre los sitios de estudio: Factor de Condición, Índice Hepatosomático, contenido de glucógeno en hígado, contenido de lípidos en hígado, contenido de lípidos en músculo, GSTcito en Branquias, AchEmicro en músculo, Índice Histopatológico en hígado e índice Histopatológico en branquias. Como criterio de clasificación se utilizaron los índices de calidad del ambiente terrestre CR e IUT, obtenidos en cada sitio.

Como puede verse en la Fig. 23, la primera componente CP1 explicó el 88,1% de variabilidad entre los índices de calidad del ambiente terrestre, mientras que la segunda componente CP2 explicó el 11,9%. Para la CP1 el  $IH_{bra}$  presentó el peso negativo más alto mientras que FC, GLU-Hig, LIP-Hig y AchE<sub>micro</sub>-MUSC recibieron los pesos positivos más altos en este eje (Tabla 19). Para la CP2 la GST<sub>cito</sub>-BRA presentó el mayor peso positivo y el IHS el mayor peso negativo de este eje (Tabla 19). Con estos dos ejes se explicó el 100% de la variabilidad total en las observaciones.

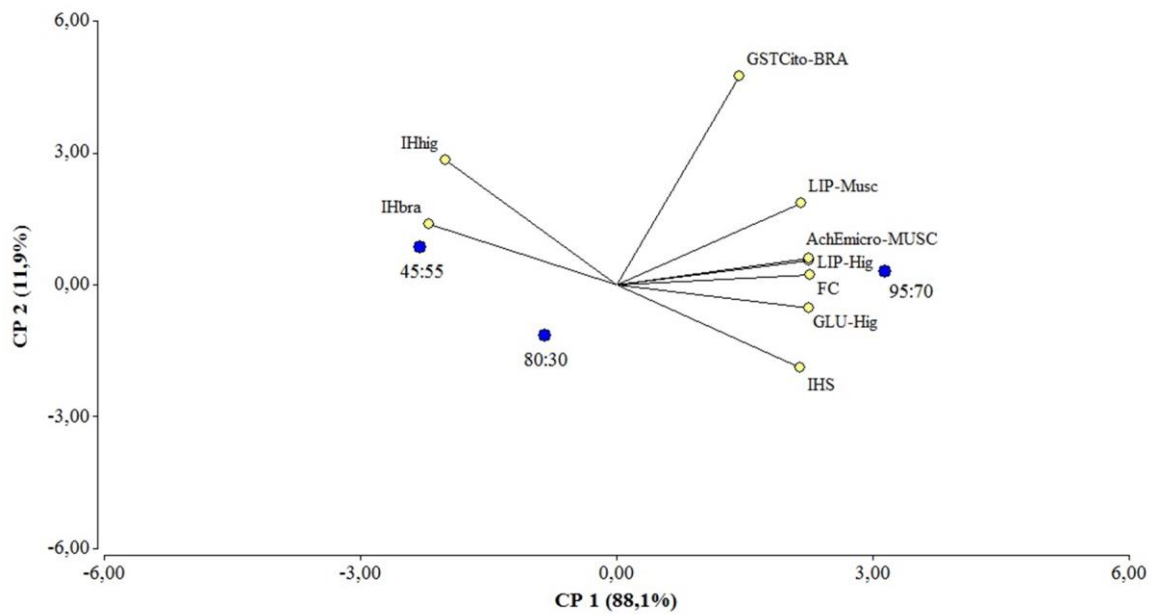


Fig. 23: Biplot de las dos primeras componentes principales mostrando la asociación entre biomarcadores consideradas en el ACP y los índices de calidad del ambiente terrestre de los sitios monitoreados en el Río Xanaes. Análisis de componentes principales. Los puntos azules representan los valores obtenidos para los índices de calidad del ambiente terrestre (CR:IUT).

Tabla 19: Autovectores de cada eje (e1 y e2) del análisis de componentes principales.

<b>Variables</b>	<b>e1</b>	<b>e2</b>
<b>FC</b>	0,35	0,04
<b>IHS</b>	0,34	-0,30
<b>GLU-Hig</b>	0,35	-0,08
<b>LIP-Hig</b>	0,35	0,09
<b>LIP-Musc</b>	0,34	0,29
<b>GST<sub>cito</sub>-BRA</b>	0,23	0,74
<b>AchE<sub>micro</sub>-MUSC</b>	0,35	0,10
<b>IH<sub>bra</sub></b>	-0,35	0,22
<b>IH<sub>hig</sub></b>	-0,31	0,45

## 5. DISCUSIÓN

La calidad de hábitat de los sistemas acuáticos está en estrecha relación con las características del cuerpo de agua y la topografía circundante, las alteraciones a nivel de la cuenca pueden producir desviaciones en el equilibrio natural de los ríos (Prat & Ward 1994). La bibliografía señala que cambios en el uso del suelo alteran los componentes del ciclo hidrológico, acelerando las escorrentías (González del Tángano del Río & García del Jalón 1998). A nivel regional, se pudo observar que el ambiente terrestre presenta diferentes grados y tipos de alteraciones antropogénicas en cada sitio (principalmente actividades urbanas, industriales o agrícolas). El área analizada en Pilar presentó el mayor grado de intervención antrópica, reflejado en una importante falta de cobertura vegetal (<10%), a lo que se suma un alto porcentaje de cultivo y la presencia de ciudades. Por su parte, Despeñaderos presentó un porcentaje de cultivo elevado (75,73%) y bajo porcentaje de construcciones (3,39%), lo que se refleja en un valor intermedio del IUT (55). La Bolsa fue el sitio que obtuvo la mejor calidad del ambiente terrestre, con el mayor porcentaje de cobertura vegetal (>50%) y menor proporción de áreas cultivadas (21,39%). Sin embargo, es importante destacar que el uso de la tierra alcanzó un valor de 70, influenciado principalmente por la presencia de ciudades y la existencia (aunque en baja proporción) de cultivos en esta área.

El estado de conservación de los ecosistemas ribereños es un elemento importante para la determinación de la calidad ecológica de los ríos, debido a que las riberas mantienen interrelaciones constantes entre el medio acuático y el terrestre que bordean (González del Tángano del Río & García del Jalón, 1998; Prat *et al.*, 2012). A partir del análisis de CR, se constató que La Bolsa y Pilar poseen riberas que no han sufrido grandes alteraciones ya que para estos sitios se obtuvieron valores de CR superiores a 80. Despeñaderos en cambio, mostró marcada alteración en sus riberas. En este sitio, las características del indicador “Naturalidad del canal fluvial”, incidieron de manera importante en el valor del índice debido a la presencia de puentes que han modificado ampliamente las características del espacio ripario. Este tipo de alteraciones, sumado a la deforestación observada en la ribera izquierda de este sitio, podrían afectar al ecosistema acuático principalmente por la carga de sedimentos suspendidos, la concentración de nutrientes y la materia orgánica que ingresan al río. Se menciona en la bibliografía que la intervención antrópica, el excesivo ingreso de materia al sistema acuático y la extracción de árboles en la zona ribereña está particularmente relacionada con una mala calidad de hábitat (Jeffrey, 2015; Granitto, 2016).

La medición de parámetros físicos, químicos y bacteriológicos del agua, es utilizada en numerosos trabajos para la evaluación de la calidad de la misma (Maggioni *et al.*, 2012; Rautenberg *et al.*, 2014; Cochero *et al.*, 2016). En el presente estudio, la evaluación a través del ICA<sub>obj</sub> mostró buena calidad de agua para los tres sitios analizados en el río Xanaes. Los valores obtenidos en un rango estrecho de 88-92, denotan una calidad marcadamente superior al río Suquía, perteneciente al mismo sistema endorreico, donde la principal fuente de contaminación es cloacal y se han registrado valores de ICA entre 40 y 50 (Monferrán *et al.*, 2011; Maggioni *et al.*, 2012). Según puede observarse en la bibliografía mencionada, el ICA<sub>obj</sub> refleja la presencia de contaminación principalmente cloacal, provocada por la presencia de grandes ciudades. El sitio Pilar presentó la mayor cantidad de bacterias coliformes, adoptando un orden de magnitud mayor que en los otros dos sitios y superando los valores aceptados para recreación humana en contacto directo con el agua (126 UFC/100ml) (SRHN, 2003). Este registro podría estar relacionado con el ingreso de efluentes cloacales sin tratamiento, proveniente de las dos ciudades (Río Segundo y Pilar) cercanas al sitio de muestreo. Además, pudo constatarse la existencia de un frigorífico aguas arriba del área muestreada (aproximadamente 900 m), lo cual podría incidir en el ingreso de heces de ganado por escorrentía aportando bacterias coliformes. A pesar de esto, los valores registrados son marcadamente inferiores (4 órdenes de magnitud) con respecto a lo registrado en sitios contaminados del río Suquía (Monferrán *et al.* 2011).

Al realizar la valoración personal, para obtener el ICA<sub>sub</sub>, encontramos que no hubo cambios respecto al ICA<sub>obj</sub> para La Bolsa y Despeñaderos, mientras que Pilar fue el sitio con mayor contaminación aparente (ICA<sub>sub</sub>=67,75). Esto puede explicarse porque al momento del muestreo en este sitio, se registró la extracción de áridos por parte de personas no autorizadas con el ingreso de caballos al río, lo cual provocó remoción del sedimento y una ligera turbidez en el agua, incidiendo en la valoración de este sitio.

Despeñaderos fue el sitio que presentó mayores valores para amoníaco, calcio, cloruros, nitratos y nitritos. Las concentraciones típicas de amoníaco total de las aguas naturales, en términos de nitrógeno, son menores que 0,1 mg/L. Concentraciones superiores podrían ser indicativas de contaminación debida a aportes antropogénicos y desechos animales (SRHN, 2003). En los 3 sitios este valor fue levemente superior, lo que indica que ninguno de los lugares está exento de contaminación. Sin embargo, al comparar los valores obtenidos en este estudio con trabajos realizados en la cuenca del río Suquía, se observa que fueron similares al

sitio menos perturbado y ampliamente inferiores a las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  halladas en lugares ubicados después de la ciudad de Córdoba (Monferrán *et al.* 2011).

Las concentraciones de nitratos en aguas superficiales dulces no contaminadas se sitúan en el rango 0,1 mg/L - 1 mg/L, mientras que las de nitritos, se ubican dentro del rango 0,025 mg/L- 0,05 mg/L (SRHN, 2003). Las concentraciones de nitratos y nitritos registradas se encuentran dentro del rango de valores normales en todos los sitios de muestreo (entre 0,4 - 0,7 mg/l y 0 - 0,005 mg/l respectivamente).

En cuanto a los sólidos disueltos, se observó un leve aumento en Despeñaderos y Pilar con respecto a La Bolsa. Esto podría deberse a la expansión de la actividad agrícola en esas zonas que llevaría a un mayor aporte de sedimentos procedentes de procesos erosivos, intensificados por la deforestación (Bonansea *et al.*, 2013). Además, esto implica un aporte adicional de agroquímicos que se vio reflejado en las concentraciones de plaguicidas detectadas en los sitios de estudio, principalmente en Despeñaderos. Las concentraciones de OD y la DBO muestran sólo leves diferencias entre sitios siendo estos niveles bajos.

El uso de índices fisiológicos como una medida de la salud de los ecosistemas acuáticos respecto a cambios a nivel del paisaje, han demostrado el beneficio de medir las respuestas en múltiples niveles jerárquicos (Jefrey, 2015). La utilización de biomarcadores, como forma de evaluar la calidad del ambiente acuático, logra reflejar el efecto de la contaminación sobre la biota en todos sus niveles (Contardo-Jara *et al.*, 2009).

El estado general de los peces es un biomarcador utilizado por numerosos autores con este objetivo (Rautenberg *et al.*, 2014; Cazenave *et al.*, 2014; Bueno-Krawczyk *et al.*, 2015). La relación entre la longitud total del cuerpo y el peso del individuo, a través de la estimación del factor de condición en peces, proporciona información sobre el crecimiento, la madurez, la reproducción, la nutrición y por lo tanto el estado de salud de una población (Arismendi *et al.*, 2011). La disminución significativa del FC fue relacionada al deterioro de la calidad de agua por Rautenberg *et al.* (2014) en *Gambusia affinis* para la cuenca del río Suquía. En el presente estudio, la disminución de este índice en *Heptapterus mustelinus* colectados en Despeñaderos se podría interpretar como un efecto del estrés producto de la contaminación, el cual puede limitar el consumo de alimento o directamente producir una disminución en la oferta de alimento, ya que las comunidades de invertebrados también pueden verse afectadas por la contaminación y modificación de riberas (Strand & Merritt, 1999).

Con respecto al IHS, numerosos estudios de laboratorio han reportado disminuciones significativas de este índice en peces expuestos a OCPs (plaguicidas organoclorados), PCBs

(bifenilos policlorados) y PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos) (van der Oost *et al.*, 2003). Por su parte Menezes *et al.* (2015) observaron que el valor del IHS disminuyó en peces privados del alimento. La disminución significativa de este índice en los individuos de Despeñaderos podría deberse a condiciones ambientales desfavorables, al estar expuestos a un medio con diversos contaminantes. Estas condiciones propician el metabolismo de reservas en el hígado, estimulado por la demanda energética del organismo, producto del estrés. En este estudio se observó que la tasa de consumo de reservas energética en hígado (glucógeno y lípidos) y músculo (lípidos) fue mayor en los peces de este sitio. El glucógeno es la forma de almacenamiento de carbohidratos en el hígado, allí se descompone enzimáticamente y se transporta a los tejidos extrahepáticos como glucosa cuando es necesario. Por ello, el glucógeno es generalmente el primer sustrato que se utiliza durante el ayuno (Navarro & Gutiérrez, 1995). Por otra parte, se describe en la bibliografía que el glucógeno hepático es rápidamente metabolizado durante situaciones de estrés (Hinton *et al.*, 2001). Pretto *et al.* (2014) encontraron disminuciones significativas del contenido de glucógeno en hígado y músculo de peces expuestos a Cadmio. La media para el contenido de glucógeno en los individuos de Pilar, no difiere estadísticamente del valor hallado en Despeñaderos ni en La Bolsa. Sin embargo, se observa una tendencia a la disminución, lo que podría reflejar una situación de contaminación intermedia. Además, el contenido de lípidos en hígado y músculo fue significativamente menor en los peces de Despeñaderos y Pilar. La disminución de triglicéridos en hígado fue reportada por Menezes *et al.* (2015) durante la privación de comida. La reducción de glucógeno y lípidos sugiere el uso de estos compuestos para suplir el costo de actividades metabólicas.

Entre la variedad de biomarcadores utilizados en estudios ecotoxicológicos, la actividad enzimática e indicadores de estrés oxidativo son usados como biomarcadores de alerta temprana en planes de monitoreo ambiental (Ochoa & Gonzalez, 2008; Ansari & Ansari, 2014; Bertrand *et al.*, 2016). En este trabajo se observó la inhibición significativa de la enzima GST en la fracción citosólica de branquias, en peces de Pilar. Entre las funciones de esta enzima, se encuentran dos papeles en la detoxificación, como catalizador de la conjugación de un xenobiótico con GSH para formar un producto S-glutationilado y con cierta actividad peroxidasa, utilizando GSH para reducir hidroperóxidos orgánicos de ácidos grasos y ácidos nucleicos, protegiendo de esta manera a los organismos del daño oxidativo (Lushchak, 2012). Este hecho revela que la función de respuesta antioxidante de la GST<sub>cito</sub> en branquias de individuos de Pilar está siendo disminuida, lo cual puede ser atribuido a

compuestos tóxicos presentes en el medio acuático. Cabe resaltar que fueron mayores los valores hallados en la fracción citosólica de todos los órganos, lo cual concuerda con lo descrito por van der Oost (2003). Si bien la actividad de GST<sub>cito</sub> en los ejemplares de Despeñaderos no difirió significativamente de los de la Bolsa, se observó una tendencia a la disminución de los valores de actividad para Despeñaderos, lo cual podría indicar signos de alteración ambiental que estén provocando un paulatino descenso en la actividad enzimática. Es ampliamente conocido que las enzimas de biotransformación y antioxidantes pueden aumentar o inhibir su actividad bajo estrés químico, dependiendo de la naturaleza del compuesto, de la intensidad y la duración de la exposición, como así también de la susceptibilidad de la especie (Cheung *et al.*, 2001). Los trabajos que observaron actividad inducida, hacen referencia al rol protector que cumple la GST como agente detoxificante y excretor de xenobióticos (Monferrán *et al.*, 2011; Maggioni *et al.*, 2012). En contraste, Padney *et al.* (2008) observaron la inhibición de GST en branquias de *Channa punctata* expuestas por largo tiempo a metales, haciendo hincapié en que las branquias de los peces están en estrecho contacto con el agua, siendo el principal órgano de absorción de los tóxicos acuáticos. La inhibición de esta enzima, puede deberse a compuestos que se unen covalentemente (por ejemplo, carcinógenos) o no covalentemente (por ejemplo, hematina y la bilirrubina) al sitio activo. En forma similar, algunos xenobióticos podrían ser inhibidores de GST (Schlenk *et al.*, 2008).

Una de las enzimas del sistema de defensa es la CAT, que tiende a inhibir la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (van der Oost *et al.*, 2003). En este estudio no se observaron diferencias estadísticas entre sitios para la actividad de esta enzima, sin embargo, se observa una tendencia de disminución en los sitios Despeñaderos y Pilar. Este resultado es coincidente con lo registrado por Bueno-Krawczyk *et al.* (2015), quienes no encontraron variabilidad entre sitios con contaminación diferencial. Con respecto al contenido de Proteínas Carboniladas, no se observó en este trabajo diferencia en el músculo de los peces. La oxidación de las proteínas es un biomarcador de daño, ya que las ROS pueden remover protones de los grupos metileno de los aminoácidos llevando a la formación de carbonilos (Ochoa & González, 2008).

Respecto a la actividad de acetilcolinesterasa, a partir de los datos obtenidos en este estudio se constató que en la fracción microsomal del tejido muscular existieron inhibiciones significativas en *H. mustelinus* colectados en Despeñaderos y Pilar, respecto a los de La Bolsa. Los plaguicidas organofosforados y carbamatos fueron diseñados como inhibidores de la actividad de acetilcolinesterasa en insectos, pudiendo afectar a su vez la actividad de



colinesterasas en organismos no blanco como peces e invertebrados (van der Oost *et al.*, 2003). Bueno-Krawczyk *et al.* (2015) observaron la inhibición de esta enzima en tejido muscular y cerebral de *Astyanax bifasciatus* como una consecuencia de la exposición a agentes anticolinesterasas provenientes de actividades antropogénicas (crecimiento poblacional, agricultura, aguas residuales y desechos de extracción minera). Además, el aumento de las concentraciones de Endosulfán fue reportado en estudios de laboratorio, como causa de la inhibición de AchE muscular en *Jenynsia multidentata* (Ballesteros *et al.*, 2009). El Endosulfán es uno OCPs que fue reportado en los sitios estudiados del río Xanaes, aunque en concentraciones inferiores a las utilizadas por Ballesteros *et al.* (2009).

El índice RBI además de identificar cuáles fueron los sitios más críticos, muestra que los contaminantes y/o los factores ambientales en diferentes sitios de estudio influyen de manera diferencial en las respuestas de los biomarcadores (Serafim *et al.*, 2012). En este trabajo, el comportamiento de los biomarcadores integrados, reveló que los individuos de *H. mustelinus* están más estresados en Despeñaderos (mayor valor de RBI), probablemente a causa de contaminación ambiental. La Bolsa presentó valores significativamente inferiores, por lo que se infiere que es el sitio menos impactado. Los mayores valores de RBI fueron descritos por Bertrand *et al.* (2016a) en crustáceos expuestos a altas concentraciones de clorpirifos (CPF), los cuales difirieron de los individuos control. Respuestas similares se observaron en peces expuestos a compuestos orgánicos perfluorados (Kim *et al.*, 2010) y en camarones y macrófitas expuestos a altas concentraciones de Zinc (Bertrand *et al.*, 2016b).

Los cambios histopatológicos han sido ampliamente utilizados como biomarcadores en la evaluación de la salud de peces expuestos a contaminantes, tanto en bioensayos (Ballesteros *et al.*, 2007; Hued *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2015) como en estudios a campo (Camargo & Martinez, 2007; Maceda-Viega *et al.*, 2010; Rautenberg *et al.*, 2014). Una de las grandes ventajas del uso de biomarcadores histopatológicos en el monitoreo ambiental es su nivel de organización, ya que permite examinar órganos diana específicos, como las branquias, el riñón y el hígado, responsables de funciones vitales como la respiración, la excreción, la acumulación y biotransformación de xenobióticos en los peces (Gernhofer *et al.*, 2001).

Numerosas investigaciones sostienen que existe una gran variedad de tóxicos en el medio acuático que afectan la estructura y función de las branquias, reportándose daños en este órgano como consecuencia de la exposición a plaguicidas organoclorados (Ballesteros *et al.*, 2007), herbicidas (Hued *et al.*, 2012), y metales pesados (Muñoz *et al.*, 2015), entre otros. A partir de los análisis histológicos de las branquias de *H. mustelinus*, se constató que los

individuos de todas las localidades estudiadas presentaron alteraciones histopatológicas. La hipertrofia y el lifting de células pavimentosas fueron los daños más frecuentes en los peces de todos los sitios y no se registraron diferencias estadísticas entre ellos. Estos daños suelen ser registrados frecuentemente, por lo que en general no marcan diferencia entre sitios de un río o época del año (Rautenberg *et al.*, 2014). Incluso se han observado individuos controles con estas alteraciones (Ballesteros *et al.*, 2007). Además, son considerados como una primera respuesta a nivel de tejido frente a plaguicidas (Hued *et al.*, 2012; Ballesteros *et al.*, 2007), metales pesados (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007) y aguas residuales (Maggioni *et al.*, 2012). Este tipo de daños son mecanismo de defensa, ya que aumentan la distancia entre el ambiente externo y la sangre, por lo que sirven como una primera barrera a la entrada de contaminantes (Mallatt, 1985).

Los únicos daños que presentaron diferencias significativas entre sitios fueron la frecuencia de registros en la fusión de laminillas secundarias y el aumento en el número de células de cloro. En ambos casos, los individuos de Despeñaderos presentaron los mayores valores, por lo que se puede inferir que la calidad del ambiente acuático en este sitio produce impactos más pronunciados en la estructura de las branquias. La fusión de laminillas es considerada un mecanismo de defensa utilizado como barrera para impedir el ingreso de contaminantes al organismo (Wood 2001). Por otra parte, el incremento en el número de células de cloro es considerada una respuesta al estrés (Nero *et al.*, 2006a). Es descrito en la literatura que en situaciones de estrés osmótico pueden encontrarse incrementos de la densidad estrechamente ligados a mejoras en el flujo de Cl y Ca (Perry, 1997; Lin & Hwang, 2004). Debido a su posición en la base de las laminillas secundarias, un aumento en su número podría prevenir el ingreso de sustancias tóxicas al sistema circulatorio, constituyendo además una barrera para la respiración.

En las branquias de los peces colectados en los sitios inferiores de la cuenca se registró la presencia de epitelocistis, enfermedad causada por diversas bacterias gram-negativas intracelulares, encontradas mundialmente en peces marinos y de agua dulce (Soto *et al.*, 2016). Estas bacterias fueron descritas como lesiones de branquias y piel por Hoffman *et al.* (1969), con hipertrofia asociada de células epiteliales infectadas y formación de quistes esféricos llenos de gránulos basófilos. Sin embargo, existe muy poca información sobre mecanismos de contagio y cómo influyen las condiciones ambientales en esta enfermedad.

Las alteraciones regresivas (pr2) y progresivas (pr3) fueron las que tuvieron mayor incidencia en las branquias, por lo tanto, fueron las que más aportaron al valor del  $IH_{bra}$ . Se

observaron diferencias significativas para  $IH_{pr2}$ , siendo mayores en los sitios inferiores de la cuenca. Este tipo de alteraciones conduce a la reducción o pérdida total de la funcionalidad del órgano, el cual es blanco de contaminantes y particularmente sensible a cambios en la calidad del agua (Camargo *et al.*, 2007). El  $IH_{bra}$  fue significativamente mayor en Despeñaderos y Pilar que en La Bolsa, lo cual refleja que la calidad del agua en estos dos sitios podría estar afectando el funcionamiento normal de las branquias. Un índice alto indica un alto grado de daño (Bernet *et al.*, 1999).

Para las variables morfométricas, el ancho del epitelio basal (AEB) y la distancia interlamelar (DI) mostraron diferencias significativas entre sitios. Contrariamente a lo que esperábamos encontrar, La Bolsa y Despeñaderos mostraron los valores más grandes del AEB. Como lo expresa Mallat (1985), el aumento del AEB representa un modo de defensa frente al ingreso de xenobióticos al organismo. Para la DI los valores más bajos fueron hallados en ejemplares de Despeñaderos diferenciándose significativamente con los de Pilar.

De manera similar, la proporción de epitelio disponible para el intercambio gaseoso (%DIG), reveló que los individuos de Despeñaderos presentaron el menor valor, el cual difiere significativamente del valor obtenido para los peces de Pilar, pero no con los de La Bolsa. Si consideramos que los valores más bajos de éste porcentaje se asocian con una degradación en la calidad del agua (Rautenberg *et al.*, 2014), se puede interpretar que los individuos de La Bolsa mostrarían un intercambio gaseoso disminuido, resultado contrario a lo esperado. Por otra parte, es importante considerar el daño fusión de laminillas, el cual incide directamente en el intercambio gaseoso, fue registrado en un mayor porcentaje en los individuos de Despeñaderos.

En el hígado, las alteraciones más frecuentes fueron dilatación de sinusoides, degeneración hidrópica, necrosis y congestión vascular. El reporte en la literatura hace referencia a que tales daños son frecuentes de encontrar en peces expuestos a diferentes fuentes de contaminación como mezclas de contaminantes orgánicos persistentes (Oliveira *et al.*, 2015), metales (Muñoz *et al.*, 2015), aguas residuales (Maceda-Viega *et al.*, 2010) y agroquímicos (Ballesteros *et al.*, 2007). Dentro de los daños más frecuentes encontrados en *H. mustelinus*, la necrosis fue el único que presentó diferencias significativas, siendo los porcentajes hallados en Despeñaderos mayores que en los otros dos sitios. Este tipo de lesión representa un daño estructural y funcional irreversible con graves consecuencias para la salud del organismo (Stentiford *et al.*, 2003). Por otra parte, la congestión vascular y la dilatación de sinusoides representan las primeras respuestas a nivel de tejido hepático frente a

contaminantes como plaguicidas organoclorados (Ballesteros *et al.*, 2007). Ambas alteraciones permiten un aumento del flujo sanguíneo, facilitando y aumentando la detoxificación.

En el hígado los disturbios circulatorios (pr1) y los cambios regresivos (pr2) fueron los que tuvieron mayor incidencia, por lo tanto, fueron los que más aportaron al valor del  $IH_{Hig}$ . A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre sitios para el  $IH_{pr1}$  y para  $IH_{pr2}$ , si existió diferencia para el índice del órgano  $IH_{Hig}$ . Para este índice los valores más altos fueron hallados en Despeñaderos lo que evidenciaría una menor calidad del agua en ese sitio.

Finalmente, el índice que integra los daños histológicos  $IH_{total}$  presentó diferencias significativas entre Despeñaderos y La Bolsa, mientras que Pilar presentó valores intermedios sin diferir de los otros sitios. Este dato ratifica el hecho de que existen perturbaciones del ambiente acuático en Despeñaderos que ponen en evidencia alteraciones en los organismos a nivel de tejidos, lo cual podría repercutir en la supervivencia de los peces.

Los resultados obtenidos a nivel del tejido hepático son coincidentes con lo hallado en los análisis histopatológicos de las branquias, donde los peces de Despeñaderos fueron los que sufrieron mayores daños. Además, este sitio fue el que obtuvo el mayor valor de RBI, lo que indica que las respuestas a nivel enzimático, molecular y de condición general del pez concuerdan con lo obtenido a nivel de tejidos. A su vez, Despeñaderos fue el sitio con la peor calidad de ribera, por lo que la escorrentía de plaguicidas provenientes de la gran cantidad de cultivos cercanos a la cuenca no estaría siendo amortiguada por el espacio ripario. Es importante remarcar el rol que tiene la zona ribereña en la preservación del recurso acuático. Etchebarne (2010) señala que los impactos de las actividades antrópicas que afectan a los ecosistemas lóticos (como el cambio en el uso del suelo) pueden ser amortiguados por una zona ribereña prístina o poco alterada. Esto podría ocurrir en el caso de Pilar dónde se obtuvo el peor puntaje para el IUT, pero la zona ribereña se encuentra conservada, y los biomarcadores denotan un daño menor que en Despeñaderos. Por otra parte, del análisis de plaguicidas se obtuvo que las aguas de Despeñaderos contienen la mayor concentración de la suma total de los organoclorados, dentro de los cuales se encuentran algunos con prohibición de uso (HCB- Hexachlorobenzene, alfa-Hexachlorocyclohexane, Dieldrin, Endrin, entre otros). Este hecho puede ser atribuido a que los OCPs, están asociados con los sedimentos los cuales pueden ser removidos durante eventos de inundación, donde pueden alcanzar concentraciones que son tóxicas para la fauna expuesta (Grote *et al.*, 2005). Cerca del punto

donde fueron colectados los peces de Despeñaderos, fue recientemente construido un puente, lo que produjo no sólo un deterioro de la calidad de la ribera, sino que además provocó una gran remoción de sedimentos. Por otro lado, es importante remarcar que Harguineguy *et al.* (2013) reportaron la presencia de metales pesados en aguas superficiales de la cuenca del río Xanaes, en un sitio con intensa agricultura ubicado entre Despeñaderos y Pilar. El ingreso de contaminantes al ambiente acuático se ve también favorecido por la pérdida de los bosques que propicia la escorrentía, la cual está en estrecha asociación con la pendiente del terreno. En Despeñaderos se registró una pendiente de casi 4 veces mayor que en Pilar, lo cual podría constituirse en otra causa que lleva al deterioro de la calidad del agua en este sitio.

En la búsqueda de evidencias sobre la relación entre parámetros biológicos (biomarcadores) y las características del ambiente terrestre de los sitios muestreados, se procedió al análisis de componentes principales (ACP). Este método, trata de encontrar con pérdida mínima de información, un conjunto de variables (componentes principales) no correlacionadas que expliquen la estructura de variación, en este caso, de la calidad del ambiente terrestre (Balzarini *et al.*, 2008). A través de este análisis se obtuvo que la CP1 asoció a los índices histológicos ( $IH_{bra}$  e  $IH_{hig}$ ) con los sitios de peor calidad del ambiente terrestre (que corresponde a Despeñaderos y Pilar). Por el contrario, las variables FC, IHS, GLU-Hig, LIP-Hig y la  $AChE_{micro}$  muscular se asociaron con el sitio de mejor calidad del ambiente terrestre (correspondiente a La Bolsa). Por lo tanto, la mayor variabilidad entre la calidad del ambiente terrestre de cada sitio muestreado podría ser explicado por estas variables. Si bien la CP2 explica un porcentaje importante de la variabilidad en la calidad del ambiente terrestre, no se observa una clara asociación entre los biomarcadores y los sitios evaluados. Los biomarcadores con mayor peso ( $GST_{cito}$  en branquias y  $IH_{Hig}$ ) favorecen la diferenciación del sitio de calidad intermedia del ambiente terrestre (Pilar) de los otros dos sitios.

## 6. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo, a través de los biomarcadores medidos a diferentes niveles de organización y de las características ambientales del territorio y del agua, ponen en evidencia contaminación en la cuenca media del río Xanaes. La perturbación del ambiente es más acentuada en el sitio Despeñaderos, mientras que en Pilar se observan signos de disturbio intermedio. La Bolsa resultó ser el sitio menos perturbado.

Los índices de calidad de agua utilizados no fueron sensibles para reflejar esta diferencia, pero el uso del pez autóctono *Heptapterus mustelinus* resultó ser un buen bioindicador del estado del ambiente acuático. A su vez, puede identificarse la importancia del mantenimiento de las riberas como factor clave que repercute en el bienestar de la vida acuática.

A través de este estudio ecotoxicológico, se realizan aportes fundamentales para conocer el estado ambiental del río Xanaes, contribuyendo ampliamente al conocimiento de esta cuenca. Al ser un estudio de campo, las respuestas observadas no pueden ser asociadas a un tóxico particular. Se necesitan análisis específicos para lograr identificar cuáles son los contaminantes presentes en el río que implican amenazas para el desarrollo de la fauna íctica.

Se destaca la importancia de ampliar el estudio de los indicadores del ambiente terrestre, la calidad del agua y los biomarcadores analizados en otras secciones de la cuenca del río Xanaes, los cuales reflejan de manera conjunta y complementaria la calidad del ambiente acuático.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abalaka, S. E., Fatihu, M. Y., Ibrahim, N. D. G., & Ambali, S. F. (2015). Gills and skin histopathological evaluation in African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* exposed to ethanol extract of *Adenium obesum* stem bark. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41(1), 119-127.
- Abdel-Moneim, A.M., Al-Kahtani, M.A., & Elmenshawy, O.M. (2012). Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, 88(8), 1028-1035.
- Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley, M.S., Jimenez, B.D., Ryon, M. G., Shugart, L.R. & McCarthy J.F. (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research* 28, 459-464.
- American Public Health Association, [APHA] American Water Works Association [AWWA], Water Environment Federation [WEF]. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Clesceri L.S, Greenberg A.H, Eaton A.D, editors. Washington, DC: American Public Health Association.
- Ansari, S. & Ansari, B.A. (2014). Toxic effect to alphamethrin on Catalase, Reduced Glutathione and Lipid Peroxidation in gill and liver of Zebrafish, *Danio rerio*. *World J Zool*, 9, 155-161.
- Arismendi, I., Penaluna, B., & Soto, D. (2011). Body condition indices as a rapid assessment of the abundance of introduced salmonids in oligotrophic lakes of southern Chile. *Lake and Reservoir Management*, 27:61–69.
- Au, D.W.T. (2004). The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 48: 817-834.
- Ballesteros, M.L., Bianchi, G.E., Carranza, M. & Bistoni, M.A. (2007). Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Journal of Environmental Science and Health Part B* 42, 351–357.
- Ballesteros, M.L., Durando, P.E., Nores, M.L., Díaz, M.P., Bistoni, M.A. & Wunderlin, D.A. (2009b) Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environmental Pollution*, 157: 1573–1580.
- Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A., Robledo C.W. (2008). Infostat. Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Bardford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Belanger, C., Vera-Chang, M., Moon, T., Midwood, J.D., Suski, C.D., Cooke, S.J. (2016). Seasonal variation in baseline and maximum whole-body glucocorticoid concentrations in a small-bodied stream fish independent of habitat quality. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 192: 1-6.
- Beliaeff, B. & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21, No. 6, pp. 1316–1322.
- Bermudez, G.M., Moreno, M., Invernizzi, R., Plá, R., & Pignata, M.L. (2010). Heavy metal pollution in topsoils near a cement plant: The role of organic matter and distance to the source to predict total and HCl-extracted heavy metal concentrations. *Chemosphere* 78:375–381.
- Bermudez, G.M.A., Jasan, R., Plá, R., Pignata, M.L. (2011). Heavy metal and trace element concentrations in wheat grains: assessment of potential non-carcinogenic health hazard through their consumption. *Journal Hazardous Materials*. 193, 264–271.
- Bermudez, G.M.A., Jasan, R., Plá, R., Pignata, M.L. (2012). Heavy metals and trace elements in atmospheric fall-out: Their relationship with topsoil and wheat element composition. *Journal of Hazardous Materials* 213–214 (2012) 447–456.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25–34.
- Bertrand, L., Asis, R., Monferrán, M.V., Amé, M.V. (2016b). Bioaccumulation and biochemical response in South American native species exposed to zinc: Boosted regression trees as novel tool for biomarkers selection. *Ecological Indicators*, 67: 769–778.

- Bertrand, L., Monferrán, M.V., Mouneyrac, C., Bonansea, R.I., Asis, R. & Amé, M.V. (2016) Sensitive biomarker responses of the shrimp *Palaemonetes argentinus* exposed to chlorpyrifos at environmental concentrations: Roles of alpha-tocopherol and metallothioneins. *Aquatic Toxicology* 179: 72–81.
- Beutler, E. (1982). Catalase. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. Grune and Stratton, New York, 105-106.
- Bonansea, R.I., Amé, M.V. & Wunderlin, D.A. (2013). Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). *Chemosphere* 90, 1860–1869.
- Boulton, A., Brock, M. (1999). Australian Freshwater Ecology. Processes and Management. Gleneagles publishing. PP. 300.
- Bradbury, S.P., Carlson, R.W., Henry, T.R., Padilla, S. & Cowden, J. (2008). Toxic Responses of the Fish Nervous System. Pp 417, en *The Toxicology of Fishes*. Di Giulio, R.T. & Hinton, D. (eds). P1071.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bueno-Krawczyk, A. C. D., Guiloski, I. C., Piancini, L. D. S., Azevedo, J. C., Ramsdorf, W. A., Ide, A. H., Guimaraes, A.T.B., Cestari, M.M. & Silva de Assis, H. S. (2015). Multibiomarker in fish to evaluate a river used to water public supply. *Chemosphere*, 135, 257-264.
- Camargo, M. M., & Martinez, C. B. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3), 327-336.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P.A., Wunderlin, D.A. (2009). Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environ. Pollut.* 157, 3025–3033.
- 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., Bistoni, M.A., Pesce, S., Wunderlin, D.A. (2006). Differential detoxication and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76, 1–12.
- Chalar, G., Delbene, L., González-Bergonzoni, I., & Arocena, R. (2013). Fish assemblage changes along a trophic gradient induced by agricultural activities (Santa Lucía, Uruguay). *Ecological indicators*, 24, 582-588.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S. (2001). Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*, 52(3), 189-203.
- Cochero, J., Cortelezzi, A., Tarda, A.S. & Gómez, N. (2016). An index to evaluate the fluvial hábitat degradation in lowland urban streams. *Ecological Indicators* 71: 134–144.
- Colin, N., Porte, C., Frenandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sostoa, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A. (2015). Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of The Total Environment*, 540, 307-323.
- Contardo-Jara, V., Galanti, L.N., Amé, M.V., Monferrán, M.V., Wunderlin, D.A. & Wiegand, C. (2009). Biotransformation and antioxidant enzymes of *Limnoperna fortunei* detect site impact in water courses of Córdoba, Argentina. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1871-1880.
- Cunco, A. M., A. A. Agostinho & J. D. Latini. (2006). Influência da urbanização sobre as assembléias de peixes em três córregos de Maringá, Paraná (Influence of urbanization upon fish assemblages in three streams of Maringá, Paraná). *Revista Brasileira de Zoologia*, 23: 1101-1110.
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Mínguez, L., Pain-Devin, S., 2014. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 1–14.
- Di Giulio, R.T. & Meyer, J.N. (2008). Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. Pp 273, en *The Toxicology of Fishes*. Di Giulio, R.T. & Hinton, D. (eds). P 1071.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Díaz-Jaramillo, M., Ferreira, J.I., Amado, L.L., Ventura-Lima, J., Martins, A., Retamal, M.R., Urrutia, R., Bertrán, C., Barra, R., Mosnerrat, J.M. (2010). Biomonitoring of antioxidant and oxidative stress responses



- in *Perinereis gualpensis* (Polychaeta: Nereididae) in Chilean estuarine regions under different anthropogenic pressure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (2010) 515–523.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Etchebarne, V. (2010). Calidad de agua y de la zona ribereña en sistemas lóticos de regiones ganaderas extensivas y lecheras de la cuenca del río Santa Lucía. Informe de pasantía licenciatura en Cs. Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de la República (Uruguay).
- Fernandez, L., & Bechara, J. A. (2010). An assessment of fish communities along a piedmont river receiving organic pollution (Aconquija Mountains, Argentina). *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 79-100.
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J. V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J., Matos, P., & Fontainhas-Fernandes, A. (2007). Histopathological changes in liver and gill epithelium of *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27(3), 103-109.
- Folch, J., Sloane, L. & Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Friberg, N., Bonada, N., Bradley, D. C., Dunbar, M. J., Edwards, F. K., Grey, J., Hayes, R.B., Hildrew, A.G., Lamouroux, N., Trimmer, M. & Woodward, G. (2011). Biomonitoring of Human Impacts in Freshwater Ecosystems: The Good, the Bad and the Ugly. *Advances in Ecological Research*, Vol. 441-68.
- George, S.G. (1994). Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. Lewis Publishers, CRC press, pp. 37/85.
- Gernhofer, M., Pawet, M., Schramm, E., Müller & R. Triebkorn. (2001). Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem, Stress and Recovery*, 8: 241-260.
- González del Tánago del Río, M. & García de Jalón Lastra, D. (1998). El río y su cuenca vertiente Pp. 19, en Restauración de ríos y riberas. Ed. Fundación conde del valle Salazar (Ediciones mundi-prensa). Madrid. P. 319.
- Granitto, M., Rosso, J.J., Boveri, M.B. & Rennella, A.M. (2016). Impacto del uso del suelo sobre la condición de ribera en arroyos pampeanos y su relación con la estructura de la comunidad de peces. *Biología acuática* 31: 19 – 27.
- Grote, M., Altenburger, R., Brack, W., Moschütz, S., Mothes, S., Michael, C., Narten G.B., Paschke, A., Schirmer, K., Walter, H., Wennrich, R. & Wenzel K-D., (2005). Ecotoxicological profiling of transect river Elbe sediments. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 33(5), 555-569.
- Guevara Soto, M., Vidondo, B., Vaughan, L., Rubin, J. F., Segner, H., Samartin, S., & Schmidt- Posthaus, H. (2016). Investigations into the temporal development of epitheliocystis infections in brown trout: a histological study. *Journal of Fish Diseases*.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S- transferases. The first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Harguinteguy, C.A., Schreiber, R., Pignata, M.L. (2013). *Myriophyllum aquaticum* as a biomonitor of water heavy metal input related to agricultural activities in the Xanaes River (Córdoba, Argentina). *Ecological Indicators* 27: 8–16.
- Haro, J. G., Bistoni M.D.L.A. (2007). Peces de Córdoba. 1a ed. Córdoba: Univ. Nacional de Córdoba.
- Hendricks, C.W. (1972). Enteric bacteria growth rates in river water. *Appl. Microbiol.* 24, 168-174.
- Hinton, D.E., Segner, H., Braunbeck, T. (2001). Toxic responses of the liver. Pp. 224, en Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleost. Schlenk, D. & Benson, W.H. (eds.). Vol. 1, P. 372.
- Hoffman, G.L., Dunbar, C.E., Wolf, K. & Zwillenberg, L.O. (1969) Epitheliocystis, a new infectious disease of the bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Antonie van Leeuwenhoek* 35, 146–158.
- Hued, A.C., Oberhofer, S. & Bistoni, M.A. (2012). Exposure to a Commercial Glyphosate Formulation (Roundup) Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch Environ Contam Toxicol* 62:107–117.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA] (2015). <http://inta.gov.ar/documentos/resumen-climatico-inta-eea-manfredi-octubre-2015>

- Jeffrey, J.D., Hasler, C.T., Chapman, J.M., Cooke, S.J. & Suski, C.D. (2015). Linking Landscape-Scale Disturbances to Stress and Condition of Fish: Implications for Restoration and Conservation. *Integrative and Comparative Biology*, pp. 1–13.
- Jorgensen, S.E. (2011). Handbook of ecological models used in ecosystem and environmental management. Denmark: Copenhagen University.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., Amara, R. (2011). Are biochemical biomarkerresponses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour?. *Comp. Biochem. Physiol.* C154, 187–195.
- Kim, W.K., Lee, S.K. & Jung, J. (2010). Integrated assessment of biomarker responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to perfluorinated organic compounds. *J. Hazard. Mater.* 180, 395–400.
- Kutschker, A., Brand, C., Miserendino, M.L. (2009). Evaluación de la calidad de los bosques de ribera en ríos del NO del Chubut sometidos a distintos usos de la tierra. *Ecología Austral* 19:19-34.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 464.
- Liew, H., Sinha, A., Mauro, N., Diricx, M., Blust, R., De Boeck, G. (2012). Fasting goldfish, *Carassius auratus*, and common carp, *Cyprinus carpio*, use different metabolic strategies when swimming. *Comp. Biochem. Physiol.* A 163, 327–335.
- Lin, L. & Hwang, P. (2004). Mitochondria-rich cell activity in the yolk-sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae acclimatized to different ambient chloride levels. *J Exp Biol* 207: 1335–1344.
- Little, E.E., Finger, S.E. (1990). Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9: 13-19.
- Livingstone, D. (1993). Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57, 195-211.
- Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Far, A.L., Randall, R.L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Maceda-Veiga, A., Monroy, M. & Viscor, G. (2010). Adolfo De Sotoa Changes in non-specific biomarkers in the Mediterranean barbel (*Barbus meridionalis*) exposed to sewage effluents in a Mediterranean stream (Catalonia, NE Spain). *Aquatic Toxicology* 100: 229–237.
- Maceda-Viega, A., Monroy, M., Navarro, E., Viscor, G., & de Sotoa, A. (2013). Metal concentrations and pathological responses of wild native fish exposed to sewage discharge in a Mediterranean river. *Science of the Total Environment*, 449, 9-19.
- Maggioni, T., Hued, A.C., Monferrán, M.V., Bonansea, R.I., Galanti, L.N. & Amé, M.V. (2012). Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquía River (Córdoba Argentina). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 337–353.
- Mallat, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4), 630-648.
- Menezes, C., Ruiz-Jarabo, I., Martos-Sitcha, J., Toni, C., Salbego, J., et al., (2015). The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): a metabolic and endocrine approach. *Aquaculture* 435, 257–264.
- Monferrán, M.V., Galanti, L.N., Bonansea, R.I., Amé, M.V. & Wunderlin, D.A. (2011). Integrated survey of water pollution in the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *J Environ Monitor* 20:1–13.
- Montenegro, D. & González, M.T. (2012). Evaluation of somatic indexes, hematology and liver histopathology of the fish *Labrisomus philippii* from San Jorge Bay, northern Chile, as associated with environmental stress. *Revista de Biología Marina y Oceanografía Vol. 47, N°1: 99-107.*
- Munné, A., Prat, N., Sola, C., Bonada, N., & Rieradevall, M. (2003). A simple field method for assessing the ecological quality of riparian habitat in rivers and streams: QBR index. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 13, 147-163
- Muñoz, L., Weber, P., Dressler, V., Baldissarotto, B. & Vigliano, F.A. (2015). Histopathological biomarkers in juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to a sublethal lead concentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113: 241–247.
- Naiman, R.J., Decamp, H. & McClain, M.E. (2005). Riparia: Ecology, Conservation and Management of Streamside Communities. Elsevier/Academic Press, San Diego.

- Navarro, I., Gutiérrez, J. (1995). Fasting and starvation. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P.(Eds.), *Metabolic Biochemistry, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier, Amsterdam, pp. 392–434.
- Nero, V., Farwell, A., Lee, L.E.J., Van Meer, T., MacKinnon, M.D., Dixon, D.G., (2006b). The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: gill and liver histopathology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 252–264.
- Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van Der Kraak, G., Lee, L. E. J., Van Meer, T., MacKinnon, M.D. & Dixon, D. G. (2006a). Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(3), 365-377.
- Ochoa, D.M. & González, J.F. (2008). Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Rev. Med. Vet. Zoot* 55:115-126.
- Oliveira, H.H.P., Liebel, S., Rossi, S.C., Azevedo, A.C.B., Barrera, E.A.L., Esquivel Garcia, J.R., Grötzner, S.R., Filipak Neto, F., Randi, M.A.F. & Ribeiro, C.A.O. (2015). Mixtures of benzo(a)pyrene, dichlorodiphenyltrichloroethane and tributyltin are more toxic to neotropical fish *Rhamdia quelen* than isolated exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122: 106–115.
- Pandey, S., Parvez, S., Ansari, R. A., Ali, M., Kaur, M., Hayat, F., Ahmad & Raisuddin, S. (2008). Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chemico-biological interactions*, 174(3), 183-192.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S. (2003). Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallagoattu (Bl. & Schn.). *Science of the total environment*, 309: 105-115.
- Perry, S. (1997). The chloride cell structure and function in the gill of freshwater fishes. *Ann Rev Physiol* 59: 325–347.
- Pesce, S.F. & Wunderlin, D.A. (2000). Use of water quality indices to verify the impact of Córdoba city (Argentina) on Suquía river. *Wat. Res.* Vol. 34, No. 11, pp. 2915-2926,
- Prat, N. & Ward, J.V. (1994). The timed river. Pp. 219-236 en: Margalef, R (ed.). *Limnology now: a paradigm of planetary problems*. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Prat, N., Rieradevall, M. & Fortuño, P. (2012). Metodología F.E.M. para la evaluación del estado ecológico de los ríos Mediterráneos. Departament d'Ecologia Universitat de Barcelona.
- Preto, A., Loro, V.L., Morsch, V.M., Moraes, B.S., Menezes, C., Santi, A. & Toni, C. (2014). Alterations in carbohydrate and protein metabolism in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100: 188–192.
- Rautenberg, G.E., Amé, M.V., Monferrán, M.V., Bonansea, R.I. & Hued, A.C. (2014). A multi-level approach using *Gambusia affinis* as a bioindicator of environmental pollution in the middle-lower basin of Suquía River. *Ecological Indicators* 48: 706–720.
- Scarsbrook, M. R., Quinn, J. M., Halliday, J., & Morse, R. (2001). Factors controlling litter input dynamics in streams draining pasture, pine, and native forest catchments. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35, 751-762.
- Schlenk, D., Handy, R., Steinert, S., Depledge, M.H. & Benson, W. (2008). Biomarkers. Pp 683, en *The Toxicology of Fishes*. Di Giulio, R.T. & Hinton, D. (eds). P1071.
- Seifter, S., Dayton, S., Novice, B., Muntwyler, E. (1950). The estimation of glycogen with anthrone reagent. *Arch. Biochem.* 25, 191–200.
- Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Fonseca, V.F., França, S., Vasconcelos, R.P., Bebianno, M.J., Cabral, H.N. (2012). Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. *Ecological Indicators* 19, 215–225.
- Sijm, D.T.H.M., Opperhuizen, A. (1989). Biotransformation of organic chemicals by fish: enzyme activities and reactions. In: Hutzinger, O. (Ed.), *Handbook of Environmental Chemistry Reactions and Processes*, vol. 2E. Springer, Berlin, pp. 163/235.
- Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W. (2003). Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar. Environ. Res.* 55, 137–159.

- Strand, M., & Merritt, R.W. (1999). Impacts of livestock grazing activities on stream insect communities and the riverine environment. *American Entomologist* 45: 13-29.
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. (2003). Marco conceptual para el establecimiento de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente, metodología para recreación humana. República Argentina.
- Sumpter, J.P., Le Bail, P.Y., Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Carragher, J.F. (1991). The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 83, 94–102.
- 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
- Vázquez, J., Miatello, R. A., &Roqué, M. (1979). Geografía física de la provincia de Córdoba. Banco Provincia de Córdoba, Córdoba, Argentina. IV. Aguas, PP. 139-211.
- Vieira, D. B. & O. A. Shibatta. (2007). Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. *Biota Neotropical*, 7: 57-65.
- von der Ohe, P.C., Dulio, V., Slobodnik, J., De Deckere, E., Kühne, R., Ebert, R.U.V., Ginebreda, A., De Cooman, W., Schüttmann, G., Brack, W. (2011). A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Science of The Total Environment*. 409: 2064–2077.
- Wendelaar Bonga, S.E.& Lock, R.A.C. (2008). The Osmoregulatory System. Pp. 401. en *The Toxicology of Fishes*. Di Giulio, R.T.& Hinton, D. (eds). P1071.
- Wood, C.M. (2001). Toxic responses of the gill. Pp. 1, en *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleost*. Schlenk, D. & Benson, W.H. (eds.). Vol. 1, P. 372.