

**Universidad Nacional
Escuela de Medicina Veterinaria
Facultad Ciencias de la Salud**

**Pasantía en el Instituto Regional de Estudios en Sustancias
Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Costa Rica**

Modalidad: Pasantía

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Ana Catalina León Bolaños

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2022

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Laura Bouza Mora, M.Sc

Vicedecana Facultad de Ciencias de la Salud

Julia Rodríguez Barahona, Ph.D

Subdirectora Escuela de Medicina Veterinaria

Kinndle Blanco Peña, Ph.D

Tutora

Freylán Mena Torres, M.Sc

Lector

Alejandra Calderón Hernández, M.Sc

Lectora

Fecha

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Don Leonardo y su familia.

A mi mamá y a mi papá.

A mis perritas.

Al Sistema de Educación Superior Pública de este país.

AGRADECIMIENTOS

La historia de una década encuentra el inicio del fin a través de este trabajo, el cual a pesar de ser humilde sostiene entre sus páginas numerosas historias de agradecimiento: A los ángeles que se han transformado: Don Leonardo por mostrarme el camino fuera del agua hacia la paz conmigo misma. Theo, Pequeña y Nova por aparecerse con tantas enseñanzas y darle un sentido emocional a todo el arduo esfuerzo que para mí implica existir.

A mis amigas: Mariela y Mar y Sol por llenarme de amistad y orgullo desde la adolescencia. Ismaels por su amistad y acompañamiento durante muchos años de la carrera. María Torres, Franciny Solano, Andrea Estrada, Esteban Palacios y Catalina Chávez por su compañía, la aventura y apoyo en medio de los momentos académicos más desesperantes. María Villalobos y Darío su ejemplo de dulzura de carácter y valentía por salir a delante y ser nosotras mismas en el proceso.

Al profesor Juan Alberto Morales por aportarme más que conocimiento sobre patología y recordarme que lo primero es la salud. La profesora Ana Jiménez con quien disfrute mucho el proceso de aprendizaje. Gracias al Instituto Regional en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional por abrirme las puertas y darme la oportunidad de realizar mi pasantía. A Kinndle Blanco, Alejandra Calderón y Freylán Mena por ser un ejemplo de profesionales para mí y por haberme guiado durante este proceso con tanta amabilidad.

A la naturaleza por darme todo lo que me apasiona y regalarme a mi gran amigo Allan Pounds quien me ha enseñado que la ciencia sin ética y amor no vale realmente la pena.

Agradezco a Ronny por aparecer mágicamente para llenarme de risas mientras camina a mi lado y ayudarme a encontrar lo necesario en mí para terminar de escribir este trabajo en la montaña.

Agradezco a mi madre, Ana Bolaños Barrientos y mi padre, Oscar León Bonilla, por todo su amor, confianza y apoyo omnipresente a lo largo de toda mi vida, sin el cual hubiese sido imposible o muy difícil haber llegado hasta acá. A mi tía Maritza por las tardes de café, por siempre darme porras y creer en mí.

Finalmente me agradezco a mí por no dejarme olvidada y traerme caminando hasta acá.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIA..... | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | iv |
| ÍNDICE DE CUADROS | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | ix |
| RESUMEN | x |
| ABSTRACT | xii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Antecedentes | 1 |
| 1.2. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET – UNA) | 11 |
| 1.3. Justificación..... | 13 |
| 1.4. Objetivos | 18 |
| 1.4.1. Objetivo General..... | 18 |
| 1.4.2. Objetivos específicos..... | 18 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 2.1. Lugar de realización de la pasantía | 19 |
| 2.2. Equipos y materiales | 19 |
| 2.3. Metodología | 20 |
| 2.3.1. Introducción al laboratorio, equipo de trabajo y participación de actividades .. | 20 |
| 2.3.2. Cuestionarios utilizados para identificar posibles fuentes de contaminación de antibióticos hacia el medio ambiente..... | 21 |
| 2.3.3. Toma y registro de datos sobre el manejo de antibióticos en actividades pecuarias para identificar las posibles fuentes de contaminación hacia el medio ambiente..... | 23 |
| 2.3.4. Apoyo al equipo interdisciplinario del proyecto “Evaluación del grado de contaminación con antibióticos en felinos silvestres y sus hábitats en los parques nacionales Braulio Carrillo, Tortuguero y Los Quetzales” | 24 |
| 2.3.5. Planteamiento y diseño de un bioensayo multinivel | 25 |
| 2.3.6. Preparación de soluciones de exposición | 26 |
| 2.3.7. Preparación del bioensayo | 27 |
| 2.3.8. Procesamiento de tejidos y cuantificación de proteínas..... | 27 |
| 2.3.9. Determinación de EROD y ChE en muestras de peces <i>P. dovii</i> | 28 |
| 2.3.9.1. Determinación de EROD..... | 28 |
| 2.3.9.2. Determinación de ChE | 30 |
| 2.3.10. Pruebas de RT-PCR..... | 30 |
| 2.3.11. Pruebas de Tasa Metabólica Basal..... | 31 |
| 2.3.12. Evaluación del comportamiento | 32 |
| 2.3.13 Análisis estadístico del bioensayo | 34 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 35 |
| 3.1. Primer objetivo | 35 |
| 3.2. Segundo objetivo | 56 |
| 3.3. Tercer objetivo | 64 |

| | |
|-------------------------------------|-----|
| 3.3.1. Análisis Molecular | 65 |
| 3.3.2. Análisis Bioquímico | 69 |
| 3.3.3. Tasa Metabólica Basal | 75 |
| 3.3.4. Comportamiento | 76 |
| 4. CONCLUSIONES | 79 |
| 5. RECOMENDACIONES | 81 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| 7. ANEXOS | 104 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Determinación de EROD. Preparación de la curva de resorufina, en un experimento realizado durante la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica... 28 | 28 |
| Cuadro 2. Información general de las fincas encuestadas aplicadas durante la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica..... 37 | 37 |
| Cuadro 3. Distribución de animales en las fincas encuestadas, durante la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica..... 39 | 39 |
| Cuadro 4. Identificación de riesgos asociados a contaminación de antibióticos hacia el medio ambiente mediante las encuestas realizadas en la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica. 42 | 42 |
| Cuadro 5. Casos de depredación y medidas de prevención implementadas según la encuesta realizada durante la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica. 55 | 55 |
| Cuadro 6. Concentraciones nominales y cuantificadas de DFZ y CPF en muestras recolectadas al inicio y final de las pruebas durante la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica. 73 | 73 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema de contenidos de la encuesta para el diagnóstico del uso de antimicrobianos aplicado durante la pasantía en IRET-UNA, Heredia, Costa Rica... | 22 |
| Figura 2. Esquema de la evaluación multinivel del bioensayo realizado durante la pasantía en IRET-UNA, Heredia, Costa Rica. Tomado de Redondo et al., 2021..... | 25 |
| Figura 3. Configuración de los tanques con agua UV para las pruebas de escototaxis, durante la pasantía en el IRET, UNA. Heredia, Costa Rica. Elaboración propia..... | 33 |
| Figura 4. Infografía #1. Sobre introducción de conceptos: una salud, resistencia a antibióticos y uso indiscriminado de antibióticos. Realizado durante la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica. Elaboración propia..... | 57 |
| Figura 5. Infografía #2. Hallazgos sobre factores de incidencia en la contaminación ambiental con antibióticos obtenidas de las encuestas aplicadas en las giras de campo y a través de llamada telefónica durante la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica. Elaboración propia. | 60 |
| Figura 6. Infografía #3. Aportes de la Medicina Veterinaria en equipos de trabajo interdisciplinarios para un proyecto de investigación con el enfoque una salud durante la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica. Elaboración propia. | 62 |
| Figura 7. Expresión relativa de Cyp1A en hígado de <i>P. dovii</i> tras exposición a mezcla de plaguicidas. Número de copias de ARNm de Cyp1A por cada mil copias del gen de referencia (beta-actina). El asterisco (*) indica diferencia significativa entre tratamientos..... | 66 |
| Figura 8. Biomarcadores enzimáticos. Actividad EROD en hígado (A), actividad ChE en cerebro (B) y músculo (C), en alevines de <i>P. dovii</i> expuestos a CPF (5.5 µg/L) + DFZ (325 µg/L). Durante un experimento en la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica..... | 70 |
| Figura 9. Tasa metabólica en alevines <i>P. dovii</i> tras exposición a una mezcla de DFZ con CLP durante 48 h, durante un experimento en la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica. | 75 |

Figura 10. *Porcentaje de tiempo que cada grupo (control y mezcla) de peces P. dovii pasó en el área clara u oscura del acuario, durante un experimento en la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica..... 76*

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

CAT: Catalasa

ChE: Colinesterasa

CICA: Centro de Investigación en Contaminación Ambiental

CPF: Clorpirifós

DFZ: Difenconazol

EROD: 7- Etoxiresorufina O-Deetilasa

GST: Glutación-S-transferasa

IRET: Instituto Regional de Estudios en Sustancias Toóxicas

LAGEN: Laboratorio de Análisis Genómico

LPO: Peroxidación de lípidos

ODK: Open Data Kid.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCR-RT: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

RAM: Resistencia Antimicrobiana

TMB: Tasa Metabólica Basal

UCR: Universidad de Costa Rica

UNA: Universidad Nacional

UV: Ultravioleta

WHO: World Health Organization

RESUMEN

Esta pasantía tuvo una duración de 344 horas y fue realizada desde el 1 de abril hasta el 1 de junio de 2020, en el Instituto Regional de Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional en Heredia, Costa Rica.

Durante la pasantía se trabajó en un proyecto de investigación que analiza el uso de antibióticos en actividades pecuarias cerca de parques nacionales realizando entrevistas a productores pecuarios de zonas colindantes con estas áreas protegidas. Se encuestaron presencialmente tres fincas cercanas al Parque Nacional los Quetzales y remotamente, dos cercanas al Parque Nacional Tortuguero. Así se identificó que entre los que respondieron el instrumento los principales riesgos de contaminación antibiótica hacia el ambiente son consecuencia de: insuficiente asesoramiento con médicos veterinarios, aplicación empírica de medicamentos, botiquines de acceso público, depredación de animales, entre otras.

Basada en la información recolectada y la experiencia vivencial, se realizó un folleto desde la perspectiva médica veterinaria sobre la dinámica participativa en un proyecto interdisciplinario bajo el enfoque una salud, que sirva para nuevos miembros del equipo y estudiantes como una guía introductoria y ejemplificativa sobre los aportes de esta profesión en las labores de investigación.

Finalmente, se participó en 120 pruebas variadas de laboratorio que evaluaron biomarcadores de contaminación en los organismos. Por ejemplo, un bioensayo multinivel con alevines *Parachromis dovii*, donde se asistió al Bach. Sergei Redondo en la toma de mediciones fisiológicas en cámaras de respirometría (20 en total) y

pruebas de escototaxis (20 en total) en un grupo de diez peces control y diez peces expuestos durante 48 h a una mezcla plaguicida de difenoconazol (325 µg/L) con clorpirifós (5.5 µg/L). También se realizaron mediciones bioquímicas: EROD en hígado (20 en total) y ChE en músculo (20 en total) y cerebro (20 en total). Así como, se llevó a cabo RT-PCR en muestras de hígado (20 en total) para la cuantificación de genes codificantes del citocromo *cyp1A*. En este bioensayo el biomarcador más sensible para detectar un evento de contaminación agudo, según la concentración utilizada, el tiempo de exposición y la especie utilizada fueron los genes codificantes de *cyp1A*.

De la pasantía se desprendió un nuevo bioensayo, que replicó la metodología utilizando alevines *P. gilli*. Del análisis comparativo de ambos resultados se publicó el artículo: “Transient exposure to sublethal concentrations of a pesticide mixture (chlorpyrifos–difenoconazole) caused different responses in fish species from different trophic levels of the same community”, que fue publicado en la revista *Comparative Biochemistry and Physiology*.

Palabras Claves: Pasantía, *Parachromis dovii*, Ecotoxicología, Contaminación, Biomarcadores.

ABSTRACT

An internship of 344 hours was carried out at the Regional Institute of Toxic Substances of the National University in Heredia, Costa Rica, from April 1st to June 1st, 2020.

During the internship, the student participated on a research project that analyzes the use of antibiotics in livestock activities near national parks, conducting interviews with livestock producers in areas adjacent to these protected areas. Three farms near Los Quetzales National Park were surveyed in person and two near Tortuguero National Park were surveyed remotely. Thus, it was identified that among those who responded to the instrument, the main risks of antibiotic contamination to the environment are a consequence of insufficient advice with veterinarians, empirical application of medicines, public access to first aid kits, animal predation, among others.

Based on the information collected and the experiential experience, a brochure was made from the veterinary medical perspective on the participatory dynamics in an interdisciplinary project, under the one health approach, which serves for new team members and students as an introductory and exemplary guide on the contributions of this profession in research work.

Finally, the student participated in 120 varied laboratory tests that evaluated biomarkers of contamination in organisms. For example, a multilevel bioassay with *Parachromis dovii* fingerlings, where Bach. Sergei Redondo was assisted in taking physiological measurements in respirometry chambers (20 in total) and scototaxis tests (20 in total) in a group of 10 control fish and 10 fish exposed for 48 h to a pesticide

mixture of difenoconazole (325 µg/L) with chlorpyrifos (5.5 µg/L). Biochemical measurements were also performed: EROD in liver (20 total) and ChE in muscle (20 total) and brain (20 total). Likewise, RT-PCR was carried out on liver samples (20 in total) for the quantification of genes encoding cytochrome *cyp1A*. In this bioassay, the most sensitive biomarker to detect an acute contamination event, depending on the concentration used, the exposure time and the species used, were the genes encoding *cyp1A*.

A new bioassay emerged from the internship, which replicated the methodology using *P. gilli* fingerlings. From the comparative analysis of both results, an article was published: "Transient exposure to sublethal concentrations of a pesticide mixture (chlorpyrifos–difenoconazole) caused different responses in fish species from different trophic levels of the same community", which was published in the Comparative Biochemistry and Physiology journal.

Key Words: Internship, *Parachromis dovii*, Ecotoxicology, Contamination, Biomarkers

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Durante las últimas décadas, las investigaciones relacionadas con la salud humana y animal han buscado resolver problemas cada vez más complejos, muchos influenciados por el aumento demográfico, la rápida e intensa expansión de la urbanización, la producción ganadera y agrícola intensificada, la invasión de ecosistemas y las dinámicas de comercio y tráfico globalizados (Zinsstad et al. 2011). Por esta razón, ha sido necesario generar conocimiento en salud desde enfoques que faciliten la ruptura de paradigmas, que dividen la salud entre los seres humanos, los animales y el planeta como silos separados.

Poco a poco han surgido conceptos que parten de una visión más global e integral. Entre estos se encuentra “Salud del ecosistema”, que acepta y amplía la forma en la que se explican los vínculos inextricables entre los ecosistemas y la salud (Zinsstad et al. 2011). También ha nacido el denominado “Una salud”, que analiza cómo la salud de las personas está estrechamente relacionada con la de los animales y del medio ambiente. Esta perspectiva busca relacionar los cambios en la población humana, uso de la tierra, cambio climático y el movimiento constante de personas y animales a través del planeta, que han llevado a la distribución mundial de enfermedades infecciosas o no infecciosas que ponen en riesgo la salud pública. A partir de este enfoque se pueden abordar, contextualizar y buscar soluciones para enfermedades infecciosas pandémicas, como el SARS-CoV-2 y el estado de

emergencia mundial por la creciente resistencia contra antimicrobianos (RAM) (CDC 2018).

Finalmente, otro abordaje a valorar es el de “Salud planetaria”, el cual intenta comprender las relaciones dinámicas y sistémicas entre los cambios globales, sus efectos en los sistemas naturales y cómo los cambios en los sistemas naturales pueden afectar la salud y el bienestar de los humanos a diferentes escalas organizativas. Estas perspectivas holísticas favorecen una mirada crítica sobre el progreso social y económico en determinados países que pareciera basarse en la explotación insostenible de sus recursos naturales y los efectos desproporcionadamente negativos en la salud planetaria y, por ende, en la salud ecosistémica y humana (Montira et al. 2019). En el caso de investigaciones relacionadas con la contaminación ambiental, es necesario generar acciones que faciliten la cooperación multidisciplinaria en áreas como: biología, química, geografía, higiene, seguridad ocupacional, salud pública, psicología, antropología médica e informática, entre otros (Dhama et al. 2013).

Para sobrepasar el enfoque conceptual y promover acciones efectivas para alcanzar la salud planetaria es necesario monitorear e informar sobre indicadores relevantes que evidencien el alcance a escalas espaciales y temporales de los cambios en los sistemas naturales. Se precisan bases con evidencia fortalecida sobre soluciones de salud planetaria, incluidos sus costos y efectos en los grupos más marginales y vulnerables. Todo esto se puede lograr a través de los procesos científicos de investigación (Montira et al. 2019).

Uno de los problemas actuales se trata de la contaminación ambiental con compuestos antimicrobianos y su amenaza para la salud pública, por el creciente desarrollo de RAM (microorganismos capaces para resistir los efectos de uno de dichos fármacos) (Calderón y Aguilar 2016). Esta resistencia es crítica hacia los antibióticos y agentes antibacterianos sintéticos, pero también existe preocupación por el uso indebido de antifúngicos, antiparasitarios y antivirales. Se fundamenta en que los microorganismos enfrentados a la presión de selección antimicrobiana adquieren y expresan genes de resistencia y luego los comparten con otras bacterias, o bien, pueden producirlos por mutaciones ocurridas al azar (Calderón y Aguilar 2016; McEwen y Collignon 2018). Es esencial recalcar que dondequiera que se utilizan estos fármacos pueden existir reservorios de resistencia; por ejemplo: entornos de granja, acuicultura, el agua y suelo (por escorrentía de aguas residuales y desechos orgánicos o farmacéuticos) (McEwen y Collignon 2018). Vinculado a esto, la Organización Mundial de la Salud ha establecido que el costo para la economía debido a la RAM (muerte, discapacidad, estancias hospitalarias más largas y necesidad de medicamentos más caros) es considerable y alarmante (OMS 2020).

La OMS ha declarado a la RAM como una de las diez principales amenazas para la salud pública mundialmente. Por otra parte, hay un limitado desarrollo clínico de nuevos antimicrobianos, por ejemplo, la OMS (2020) expuso que en el 2019 se identificaron 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico contra una lista patógenos prioritarios. No obstante, de estos 32, solo seis se clasificaron como innovadores. Asimismo, en el Informe del 2019 de las Naciones Unidas, por el “Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance”, se determinó que las enfermedades

farmacorresistentes ya causan al menos 700 000 muertes al año en todo el mundo y se espera que para el 2050 la cifra aumente a diez millones de muertes al año, si no hay un esfuerzo conjunto y urgente por solucionar la resistencia a los antimicrobianos. Un dato alarmante es que, para el 2030, la resistencia a estos fármacos llevaría a 24 millones de personas a la pobreza extrema (IACG 2019).

Costa Rica no se encuentra exenta de esta realidad. El decreto ejecutivo de la Presidencia de la República y el Ministerio de Salud de Costa Rica 41.385-S oficializó el “Plan de acción nacional de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos. Costa Rica 2018-2025” (Amador-Muñoz et al. 2018). Allí se expone que la RAM se ha distribuido en el territorio nacional, donde se han reportado casos de microorganismos resistentes en hospitales y comunidades, tales como: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (INCIENSA 2011; Amador-Muñoz et al. 2018).

En el sector agrícola y animal también ha habido diversos estudios que muestran la evidente exposición a la RAM. Un estudio reportó bacterias del género *Enterococcus* en muestras de leche no pasteurizadas del Gran Área Metropolitana. Todas mostraron una resistencia importante a antibióticos. La familia de los aminoglicósidos resultó ser la menos eficiente para limitar el crecimiento de estas bacterias. Para el caso de la eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol, la resistencia fue menor al 50%. Se encontró además un 8% de resistencia a la vancomicina, siendo este un antibiótico de última línea para bacterias Gram positivas (Araya et al. 2005).

Otra investigación determinó la presencia de genes de resistencia a los antimicrobianos en las palomas que habitan en zonas urbanas y que pueden actuar como reservorios de bacterias y vectores resistentes para los humanos (Blanco et al. 2017). Igualmente, otro estudio realizado en mapaches urbanos en Costa Rica confirmó la existencia de múltiples serovares de *Salmonella* resistentes a dos antibióticos utilizados para tratar la salmonelosis humana circulando en una población de estos animales (Baldi et al. 2019). Todos estos estudios recalcan la importancia de la vigilancia activa de la RAM desde los diversos sectores de la sociedad (Rojas 2014).

El uso excesivo de las drogas en el sector humano, animal y agrícola se considera una de las principales causas de RAM. En ese sentido, la utilización inadecuada de estos en clínica humana y medicina veterinaria (incluyendo acuicultura), así como en la agricultura, contribuye a la selección de bacterias resistentes a antibióticos por presión selectiva (INCIENSA 2011; McEwen y Collignon 2018). Igualmente, otra causa fundamental es la propagación de bacterias y sus genes de resistencia por el control deficiente de las infecciones causadas por bacterias, el movimiento geográfico de animales y humanos infectados y la contaminación ambiental (McEwen y Collignon 2018).

Debe entenderse que las causas implicadas en la resistencia antimicrobiana se presentan de una forma compleja y se alinean con otros problemas contemporáneos como la fragmentación y degradación de los bosques en las interfaces entre los humanos y la naturaleza, de forma que, en el país, estudios han llegado a identificar a través de técnicas moleculares, genes de resistencia a antimicrobianos en felinos silvestres, *Panthera onca* y *Puma concolor* que habitan zonas protegidas. Este estudio

indicó la posibilidad de que las actividades pecuarias tengan relación con el hallazgo de estos genes de resistencia, aspecto que es importante continuar investigando para comprender las acciones humanas que pueden llevar a la distribución de estos genes en la naturaleza (Angulo et al. 2017).

En investigaciones realizadas por la organización no gubernamental (ONG) Panthera se han logrado identificar casos de depredación de ganado que podrían relacionarse con la generación de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en animales silvestres (Rojas 2019).

En relación con la medicina veterinaria, la FAO indicó que entre las posibles razones para el desarrollo de la resistencia se encuentra el uso innecesario de antibióticos vinculado a diagnósticos incorrectos, la dosificación errónea o inexistente, junto a intervalos entre dosis inconvenientes para el fármaco y la prescripción de medicamentos sin un adecuado conocimiento de este (Errecaide 2004). Por lo que, indiscutiblemente, el uso racional de dichos antimicrobianos en todos los sectores productivos es la herramienta primordial para evitar entrar en la época pre-antibiótica (Errecaide 2004).

En Costa Rica se han desarrollado diferentes investigaciones en la temática indicada anteriormente. Un ejemplo corresponde al proyecto “Evaluación del grado de contaminación con antibióticos en felinos silvestres y sus hábitats en los parques nacionales Braulio Carrillo, Tortuguero y Los Quetzales”, en el cual fue posible recopilar y documentar información sobre el uso de dichas sustancias en 17 fincas pecuarias cercanas a los parques nacionales Tortuguero y Los Quetzales, a partir de

cuestionarios aplicados a los productores. El estudio permitió conocer qué productos utilizan, cómo los aplican y qué asesoría han recibido estas personas, así como su grado de conocimiento sobre la problemática. Los resultados mostraron que los ganaderos cercanos al Parque Nacional Tortuguero utilizan más tetraciclinas, mientras que los que se hallan en las inmediaciones del Parque Nacional Los Quetzales, hacen mayor uso de los betalactámicos, representando así un riesgo para la salud del ecosistema (Rojas 2019). Además, se logró evidenciar la falta de capacitación de los productores sobre el correcto manejo de estos fármacos (Rojas 2019; Venegas 2019).

Otro problema importante relacionado con la contaminación ambiental en Costa Rica es el impacto producido por contaminantes como plaguicidas y otras sustancias provenientes del sector agropecuario (Masis et al. 2008; Castillo et al. 2012).

Según el informe final del Estado de la Nación 2012, el país no cuenta, a nivel gubernamental, con un plan de monitoreo de calidad de agua enfocado en la presencia de plaguicidas, de forma que la información generada en su mayoría ha sido obtenida por investigaciones del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) de la UNA y el Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA) de la UCR. Para investigar sobre los efectos de estos contaminantes en el ambiente, ha sido necesario valorar las especies animales nativas del país que pueden verse expuestas a la sustancia en cuestión para hacer una estimación del efecto ecológico de la exposición (Castillo et al. 2012).

Algunas especies características o nativas de un sitio en estudio pueden convertirse en especies centinela y ser utilizadas para valorar el impacto de la

contaminación en el lugar (Mena et al. 2014b). Posterior a la elección de dichas especies es necesario determinar los métodos más convenientes para estudiar los efectos tóxicos del contaminante de interés en la especie estudiada, como la aplicación de biomarcadores, los cuales indican la respuesta (señales fisiológicas) de un organismo frente a la agresión de un xenobiótico. Estos biomarcadores pueden ser moleculares, bioquímicos y hasta manifestaciones etológicas de los animales, entre otros (Gil 2000), y pueden aparecer en momentos distintos del proceso conducente a la enfermedad. Por estas razones, es pertinente hacer una sabia elección del biomarcador a evaluar (Gil 2000; Delfino et al. 2017).

En el caso de biomarcadores moleculares se ha identificado diversos genes que se expresan en casos de estrés fisiológico, como al que se llega cuando un pez está en un medio contaminado. Por ello, su determinación se vuelve una herramienta útil para monitorizar el impacto ambiental de un evento de contaminación, ya que funcionan como alarmas tempranas de exposición ante un evento que cause estrés fisiológico (Navarro et al. 2014).

En otro estudio sobre bioacumulación en peces medakas se utilizaron biomarcadores para evaluar los efectos del difenoconazol (fungicida triazol, DFZ), el cual actúa sobre el sistema de biotransformación y se acumula en los tejidos de los organismos que lo ingieren. En este trabajo, los animales fueron expuestos a distintas concentraciones del fungicida por 180 días. Los resultados mostraron una sobreexpresión del ARNm del citocromo hepático *cyp1A1*, *cyp1B*, *cyp1C1*, *cyp27B* y *cyp3A40*, así como la disminución en la expresión de los genes codificantes para los citocromos *cyp3A38* y *cyp27A1*. También se observó que la actividad de

etoxiresorufina-O-detilasa (EROD) en el hígado aumentó en todos los grupos tratados, mientras que la actividad de la glutatión-s-transferasa (GST) aumentó en los grupos que recibieron las dosis más altas. Estos resultados sugirieron que las exposiciones crónicas a bajas dosis del compuesto pueden resultar en su bioacumulación en los peces y ocasionar inducción en el sistema de biotransformación (Zhang et al. 2017).

En el país se han utilizado pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR) para la cuantificación de los niveles hepáticos de ARNm de dos genes relacionados con el proceso de biotransformación y disrupción endocrina en peces nativos *Parachromis dovii* (Cichlidae) y *Poecilia gillii* (Poecillidae) en sitios contaminados con pesticidas, cerca del Parque Nacional Palo Verde (Navarro et al. 2014). Para tal efecto, se evaluó un gen relacionado con efectos estrogénicos, la vitelogenina y un gen que responde ante compuestos tipo dioxina, el Citocromo P4501A (*cyp1A*). Para ambas especies se diseñaron y validaron tratamientos experimentales con modelos efectores (17-estradiol y B-Naphtoflavona, respectivamente) y se demostró su utilidad como marcadores de exposición a algunos contaminantes. En este estudio se clonaron y secuenciaron parcialmente los segmentos ARNm que codifican para vitelogenina y *cyp1A1*, cuyas secuencias parciales tuvieron una alta homología con otras encontradas en especies cercanas de peces. En el estudio se logró observar diferencias en la expresión de genes ante la exposición con los modelos inductores de 17 estradiol y B-naphtoflavona (Navarro et al. 2014).

Recientemente se estudió la toxicidad del insecticida organofosforado, clorpirifós y del fungicida triazol, difenoconazol en *P. dovii*, los cuales fueron expuestos

a dosis subletales de ambas sustancias de forma individual y en mezcla para evaluar la respuesta de los biomarcadores: etoxiresorufina-O-detilasa (EROD), catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y la peroxidación de lípidos (LPO) en tejidos hepáticos y branquiales como marcadores de procesos de estrés oxidativo y biotransformación. También se cuantificó la actividad de la colinesterasa (ChE) como un biomarcador de neurotoxicidad en el cerebro y músculo. Los resultados mostraron una inhibición significativa de la actividad ChE en cerebro y músculo de los peces expuestos a clorpirifós (CPF). Sin embargo, no se produjo una inhibición de su actividad cuando los peces se expusieron a la mezcla de esta sustancia con difenoconazol (DFZ). En los animales expuestos a la mezcla se observó un aumento significativo en la actividad de EROD en el hígado (Jiménez 2019). Además, se evidenció que existe una interacción de ambas sustancias que afecta el metabolismo de biotransformación aún a niveles subletales de exposición (Jiménez 2019).

Los cambios bioquímicos y moleculares antes mencionados como consecuencia a la exposición de xenobióticos implican para el individuo un costo metabólico (Calow 1991). De forma que bajo condiciones de estrés, se requiere energía adicional para destinarla a los procesos de detoxificación y reparación, de forma que aumenta el consumo de oxígeno y la tasa ventilatoria del pez como evidencia de una disminución en la capacidad del pez para resolver las perturbaciones ambientales (Yang et al. 2000; Prassana et al. 2020) Por esta razón, a través de pruebas de respirometría se puede evaluar el consumo de oxígeno de los individuos y utilizar este parámetro fisiológico como biomarcador (Sandoval-Herrera et al. 2019).

Todos los posibles cambios anteriormente descritos suceden en el individuo en sus distintos niveles de organización y pueden ser traducidos como cambios en el comportamiento también, que llegan a suceder como respuesta a factores tanto internos (fisiológicos) como externos (ambientales). El comportamiento del individuo resulta de la integración de muchas variables fisiológicas como los sentidos, el balance hormonal, la función neurológica y el metabolismo (Scott y Sloman 2004).

En los peces, una forma de valorar si su comportamiento ha cambiado frente a un evento estresante es realizar pruebas de escototaxis, las cuales son metodologías no invasivas que funcionan como biomarcadores tempranos que evidencian condiciones acuáticas de estrés. Dichas pruebas resultan útiles en estudios de ecología y comportamiento en investigaciones ecotoxicológicas y en la monitorización de la calidad del agua (Robinson 2009). Su uso consiste en tratar de determinar si el pez sostiene el comportamiento normal de preferir los sitios oscuros por sobre los sitios claros, como una forma de disimularse con el entorno para evitar ser depredado (Sloman y McNeil 2012).

1.2. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET – UNA)

Fue creado en 1998 como un centro académico de carácter público dedicado a la investigación, docencia y proyectos de extensión. Cuenta con más de 30 años de experiencia en el diagnóstico de sustancias tóxicas utilizadas en la región centroamericana, así como en la evaluación y gestión de problemas relacionados con la calidad ambiental y salud pública. Sus investigaciones integran la exposición, efectos y los posibles riesgos asociados al uso de sustancias contaminantes (IRET-UNA 2012).

A lo largo de la historia, el IRET-UNA se ha enfocado en formar profesionales que sean capaces de entender, describir y proponer soluciones adecuadas a problemas ambientales y de salud pública, que históricamente han aumentado por la magnitud y diversidad de las formas de contaminación en Costa Rica y la región. Esto se ha logrado a través de la cooperación multidisciplinaria de profesionales y estudiantes de diversas carreras (IRET-UNA 2012).

Actualmente, se organiza en cuatro áreas de trabajo:

- Diagnóstico de importación y de uso de plaguicidas y otras sustancias tóxicas.
- Salud (exposición efectos y riesgos en la salud y las poblaciones humanas, trabajo y salud pública).
- Ambiente (exposición, efectos y riesgos en la salud de los ecosistemas).
- Química ambiental (destino ambiental de los contaminantes, metodología de muestreo y análisis e investigación y apoyo en procesos de certificación e implementación de tecnologías limpias) (IRET-UNA 2012).

El IRET-UNA tiene influencia en todos los países centroamericanos, tanto así que la OMS lo ha declarado Centro Colaborador en las áreas de epidemiología y toxicología ocupacional y ambiental. Así mismo, por recomendación del Ministerio de Salud (MinSa) se le ha nominado como Centro Colaborador de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para la ejecución del “Programa regional de acción y demostración de alternativas sostenibles para el control de los vectores de la malaria sin uso del DDT en México y América Central”. De igual manera, el Laboratorio de

Análisis de Residuos de Plaguicidas (LAREP), también por recomendación del MinSa, ha sido designado como un laboratorio de referencia a nivel regional por la OPS (IRET-UNA 2012).

El Instituto se caracteriza por promover el trabajo conjunto con otras unidades académicas de la UNA, por ejemplo, la Escuela de Ciencias Biológicas y la Escuela de Medicina Veterinaria.

1.3. Justificación

En la actualidad existen severas crisis relacionadas con el mal uso de recursos naturales y materias primas, que particularmente amenazan las fuentes de agua potable (García 1997). También es posible evidenciar múltiples consecuencias de un cambio climático en proceso, el cual afecta mayormente a las poblaciones rurales (Zinsstad et al. 2011).

Para poder atender y entender los contextos actuales que interconectan a los humanos, animales de compañía, ganado y vida silvestre con su entorno social y ecológico es necesario un manejo integral de su salud bajo distintos enfoques, como por ejemplo “Una Salud” y “Salud Planetaria” (Zinsstad et al. 2011; Montira et al. 2019). Esto facilita identificar y comprender las acciones concretas que están generando el problema desde distintas perspectivas. Un ejemplo corresponde a los productores agrícolas y los problemas ambientales relacionados con la actividad agropecuaria.

Las perspectivas de cada persona involucrada, tanto en el problema como en la solución, se ven influenciadas por factores educativos, nivel socioeconómico, diversidad cultural, características personales y hasta el beneficio o perjuicio que

perciben de la situación. Por tanto, muchas veces las acciones que están ocasionando un problema ambiental tienen orígenes complejos y diversos que requieren de más de un enfoque para conseguir una solución integral en la que se beneficien los distintos participantes (Murillo y Tobasura 2011).

Lamentablemente aún se siguen tratando los problemas ambientales como silos disciplinarios separados y alejados entre la salud humana y la salud animal, sin lograr aplicar una conexión lógica y necesaria entre ambos. Por esta razón, se debe seguir reforzando la aplicación de la ciencia de forma coherente con conceptos holísticos y no de forma sectorial, como se ha acostumbrado (Zinsstad et al. 2011). Esto se puede lograr a través de metodologías de investigación y de trabajo cada vez más multidisciplinarias e interdisciplinarias, las cuales pueden fortalecerse a través de la práctica profesional en equipos de trabajo diversos y colaborativos de distintas ramas científicas y de otros campos (Dhama et al. 2013).

El aumento de la resistencia a antibióticos es uno de estos problemas que precisan de un entendimiento integral, ya que, por su naturaleza, tiene graves consecuencias negativas para la salud animal, pública y ambiental. Para ser capaces de comprenderlo y buscar soluciones pertinentes que busquen un desarrollo saludable en relación con el ambiente se requiere de la aplicación de enfoques multidisciplinarios (Venegas 2019). Se sabe que en las actividades productivas animales es necesario el uso de distintos medicamentos para prevenir o tratar enfermedades, pero estos deben ser usados racional y críticamente para evitar el aumento de la resistencia a nivel mundial (Rojas 2019).

Se estima que, mundialmente, la mitad de los antibióticos producidos son destinados para uso veterinario. Alrededor del 80% es dirigido a producciones intensivas de cerdos, aves y bovinos y un 5%, a piscicultura. Asimismo, existe un porcentaje que no se usa con fines terapéuticos, sino que es incorporado al alimento como un promotor del crecimiento (Esperbent y Migliorati 2017). Debido a esto, resulta crucial entender y evaluar el uso que se le da a estos medicamentos en las fincas del país para poder obtener una perspectiva general de la situación y generar acciones de capacitación pertinentes para los productores, reforzar las prácticas de manejo e identificar las formas en las que los animales silvestres son impactados por esta situación (Venegas 2019).

En Costa Rica, distintas actividades productivas animales se desarrollan ampliamente en todo el territorio nacional, lo que favorece diversas interacciones entre las especies productivas, domésticas, silvestres y los seres humanos (Rojas 2019). En muchas ocasiones, estas interacciones derivan de la competencia por recursos naturales y una estrecha cercanía que favorece el contacto entre los actores. Los antibióticos utilizados en las actividades productivas que no se utilizan de forma prudente pueden terminar en el ambiente, por ejemplo: en el suelo, cuerpos de agua, tejidos, restos de animales, o bien, en sus excreciones. Esta exposición sobre todo a bajas dosis favorece la generación de microorganismos resistentes o inmunes a estos medicamentos (Cota et al. 2014; Venegas 2019).

El contexto socioeconómico de un país es relevante para comprender los problemas ambientales y sus soluciones. La agricultura es una actividad económica muy importante en Costa Rica, de forma que en el 2018 las exportaciones de banano,

piña y café representaron un 21% de las exportaciones totales. La piña se colocó como uno de los productos con mayor crecimiento en los índices de exportación durante el 2018 al ser esta actividad tan intensa han surgido problemas por el uso desmesurado de plaguicidas (COMEX 2018).

Investigaciones previas ya han advertido sobre algunas consecuencias indeseables del uso de plaguicidas, como: contaminación de sustratos y aguas, reducción de los sistemas de producción posibles en un sitio, diversos procesos de biomagnificación o bioconcentración, pérdida de biodiversidad de los agroecosistemas, destrucción catalítica de la capa de ozono, entre otros (García 1997). También trae consecuencias para los ecosistemas naturales al relacionarse con la muerte de peces y deterioro de la calidad del agua potable, situaciones comprobadas al analizar y detectar residuos de plaguicidas en las aguas superficiales provenientes de las plantaciones (Echeverría et al. 2018). Por ejemplo, plaguicidas como clorpirifós (CPF) y difenoconazol (DFZ) son muy utilizados en los cultivos de banano y piña en el Caribe y han sido registrados en ecosistemas acuáticos, representando un riesgo para los distintos organismos que ahí habitan (Mena et al. 2014a; Mena et al. 2014b; Jiménez 2019).

Por todo lo anterior, ha sido necesario el monitoreo de biomarcadores en especies centinelas al evaluar eventos de contaminación. Esta metodología ha sido útil en los estudios ecotoxicológicos para indicar señales tempranas de estrés en los ecosistemas. Además, son herramientas rápidas de adecuada sensibilidad para comprender las consecuencias ecológicas de los eventos de contaminación (Mena et al. 2014a; Mena et al. 2014b; Jiménez 2019).

Los problemas ambientales contemporáneos suceden en sociedades muy diversas, dinámicas y complejas. Por esto, es importante que la persona estudiante de medicina veterinaria amplíe su formación multidisciplinar a través de aprendizajes vivenciales, para que incorpore y contextualice su profesión dentro de equipos multidisciplinarios e interdisciplinarios, con profesionales de otras ciencias exactas, sociales y otras ramas, bajo distintos enfoques como Una Salud o Salud Planetaria, como sucedió en esta pasantía.

Estas participaciones facilitarán respuestas más responsables, pertinentes, creativas y modernas a los retos actuales y futuros (Pagani 2011). Asimismo, es importante que las y los estudiantes de medicina veterinaria se motiven a incorporarse en campos históricamente no tradicionales, lo que permitirá ampliar los espacios de injerencia de la profesión en temáticas en las cuales ha faltado la perspectiva médica veterinaria, lo que favorecería la diversificación de oportunidades de trabajo, obteniendo más herramientas conceptuales para aportar a las labores de vigilancia ambiental, salud pública y conservación (Pagani 2011). Por todo lo anterior, haber realizado la pasantía en el Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas resulta positivo para los estudiantes de la Escuela de Medicina Veterinaria por ser una oportunidad de acercamiento entre ambos actores académicos de la institución, de forma que se pueda conocer más el trabajo y los aportes que pueden brindar cada uno y favorecer el intercambio entre ambas unidades.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Aplicar los conocimientos, habilidades y destrezas obtenidos en la carrera de Licenciatura en Medicina Veterinaria en investigaciones vinculadas con contaminantes que pueden afectar la salud animal y ambiental, realizadas en el Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas.

1.4.2. Objetivos específicos

1.4.2.1. Construir las capacidades necesarias para tomar y registrar datos sobre el manejo de antibióticos en actividades pecuarias para identificar las posibles fuentes de contaminación hacia el medio ambiente.

1.4.2.2. Apoyar al equipo de trabajo interdisciplinario del proyecto “Evaluación del grado de contaminación con antibióticos en felinos silvestres y sus hábitats en los parques nacionales Braulio Carrillo, Tortuguero y Los Quetzales” desde una perspectiva médica veterinaria, para complementar el enfoque “una salud” que desea incorporarse en las labores de campo vinculadas a la investigación.

1.4.2.3. Aplicar métodos de biomarcadores bioquímicos y transcriptómicos en peces para obtener destrezas necesarias en técnicas de laboratorio vinculadas con la evaluación del impacto de contaminantes químicos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de realización de la pasantía

La pasantía se realizó del 1 de abril hasta el 1 de junio de 2020, con un total de 344 horas, en el Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional (IRET-UNA) y en giras de campo realizadas en fincas cercanas al Parque Nacional los Quetzales, San Gerardo de Dota, San José.

2.2. Equipos y materiales

Durante la pasantía se utilizaron distintas instalaciones dentro del Campus Omar Dengo de la Universidad Nacional:

- IRET: los laboratorios de Ecotoxicología (ECOTOX) y de Análisis de Residuos de Plaguicidas (LAREP).
- Escuela de Ciencias Biológicas: el Laboratorio de Análisis Genómico (LAGEN).

Para poder llevar a cabo las actividades diarias fue necesario utilizar frecuentemente equipos como: refrigeradoras, congeladores a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, centrífugas y microcentrífugas, balanzas, cabinas de flujo laminar vertical, homogeneizador de tejidos, baño maría, criostato, computadoras, agitadores vórtex, cámara de electroforesis, pinzas, tijeras, Nanodrop 1000, PCR en tiempo real, incubadora de huevos, ultracentrífuga, pipetas, pipeteadores electrónicos y cristalería. En cuanto a los reactivos y materiales utilizados, se cita al Kit E.Z.N.A® Viral RNA Kit

R6874-02 de Omega Biotek, además de los necesarios para extracción de ARN por medio de TRIzol®.

2.3. Metodología

Los procedimientos en los cuales se participó fueron documentados en una bitácora escrita a mano. La pasantía se desarrolló en las siguientes etapas:

2.3.1. Introducción al laboratorio, equipo de trabajo y participación de actividades

Durante la primera semana se otorgaron las indicaciones de bioseguridad al momento de utilizar las instalaciones respectivas, particularmente del laboratorio ECOTOX. Estas se intensificaron por el contexto de la pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2. Las indicaciones fueron recibidas a través de circulares oficiales de lectura obligatoria y explicaciones orales durante el recorrido de familiarización con las instalaciones de dicho laboratorio. Así mismo, se me mostraron los equipos utilizados en cada una de las diferentes actividades y pruebas, particularmente, se me explicó su funcionamiento y sus cuidados básicos. Fue necesario también repasar y conocer los programas de computación con los que trabajaría durante la pasantía.

Durante la pasantía colaboré con diferentes profesionales: durante la modificación del formato de las encuestas se trabajó con el Bach. Jorge Peñaloza, las infografías se realizaron con ayuda de Bach. Brenda Zamora Rojas y Bach. Mariela Montero Arias. En el laboratorio todas las mediciones bioquímicas (análisis de EROD y ChE) se realizaron con la MSc. Katherine Jiménez, durante las pruebas de

respirometría y evaluación del comportamiento en peces asistí a Bach. Sergei Redondo. Las pruebas moleculares de RT-PCR se realizaron en conjunto con la PhD. Kinndle Blanco y el MSc. Freylán Mena.

2.3.2. Cuestionarios utilizados para identificar posibles fuentes de contaminación de antibióticos hacia el medio ambiente.

Durante la pasantía se laboró con un grupo de trabajo que estaba realizando unos cuestionarios para identificar posibles fuentes de contaminación de antibióticos hacia el medio ambiente, revisé los cuestionarios en su totalidad, de forma que se hicieron modificaciones con relación a la terminología utilizada, el orden de las preguntas, se incorporaron aclaraciones necesarias para ser utilizadas por la persona entrevistadora, se omitieron interrogantes y se agregaron otras nuevas.

A la vez, se hicieron cambios importantes en el formato de la encuesta, la cual se presentaba en formato de Word para que los datos fueran registrados sobre papel a través de secciones como: complete, selección múltiple, selección única, opciones de falso o verdadero y numerosos cuadros de selección múltiple. Todos los anteriores fueron transformados a preguntas consecutivas en el programa de Excel. Los datos fueron añadidos al formato xlm, para ingresarlos al software Open Data Kit (ODK) el cual permite programar variables y preguntas para su implementación en diversos dispositivos, como computadoras o móviles a partir de formularios digitales (ODK 2020). Este último paso (actualmente en proceso) está a cargo del Bach. Jorge Peñaloza Castañeda.

La información de las encuestas fue categorizada en tres hojas de Excel de la forma que lo requiere el programa ODK: *Survey*, *Choices* y *Settings*. En la primera se utilizaron cuatro columnas: la primera para agregar el tipo de respuesta de cada cuestionamiento (por ejemplo: selección única, decimal o *String*), en la segunda se le dio un nombre a cada interrogante, en la tercera se colocó la pregunta textual y en la última, se observó su numeración correspondiente. En la hoja de *Choices* se utilizaron tres columnas principales: un nombre para cada pregunta, las opciones de respuesta y el número correspondiente. Por último, en la hoja de *Settings* se colocó la configuración del idioma y el título de la encuesta (Figura 1).

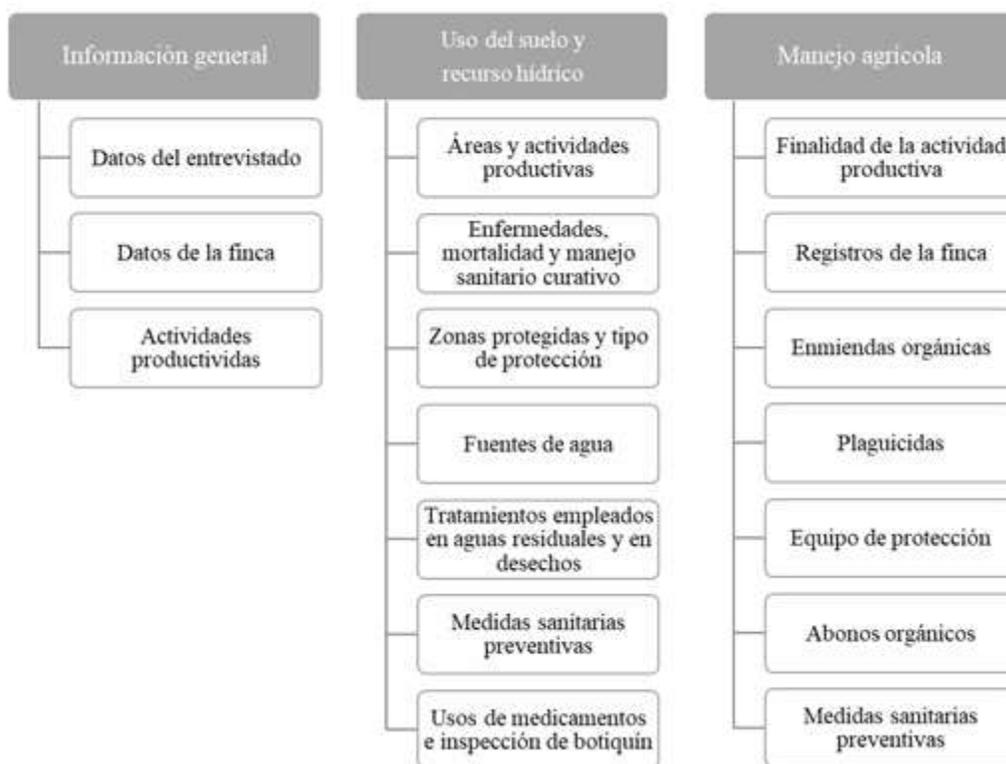


Figura 1. Esquema de contenidos de la encuesta para el diagnóstico del uso de antimicrobianos aplicado durante la pasantía en IRET-UNA, Heredia, Costa Rica.

2.3.3. Toma y registro de datos sobre el manejo de antibióticos en actividades pecuarias para identificar las posibles fuentes de contaminación hacia el medio ambiente.

En un principio, todas las encuestas fueron programadas para aplicarse de forma presencial, pero por la complejidad de realizar giras de campo a la zona Caribe del país durante la pandemia, la dinámica debió modificarse de forma que se realizaron tres giras de campo a tres fincas agropecuarias en la zona de San Gerardo de Dota, cercanas al Parque Nacional los Quetzales. Durante estas, se aplicaron los cuestionarios del proyecto “Evaluación del grado de contaminación con antibióticos en felinos silvestres y sus hábitats en los parques nacionales Braulio Carrillo, Tortuguero y Los Quetzales”, los cuales fueron previamente trabajados. También se realizaron dos encuestas vía telefónica a dos fincas pecuarias cercanas al Parque Nacional Tortuguero.

Durante los días previos a realizar las encuestas, se les consultó a las personas participantes de la zona caribe si estaban familiarizados con programas o aplicaciones como Google Meets, Zoom o llamadas y video llamadas por WhatsApp. Uno de los encuestados indicó haber manejado Google Meets y WhatsApp en algún momento, mientras que el otro encuestado dijo no manejar ninguna de esas aplicaciones. Ambos coincidieron en que en la zona rural donde viven el internet es muy inestable y de acceso complicado, por lo que no hacen uso frecuente de los recursos virtuales, por esta razón indicaron que la forma más sencilla de comunicarse para ellos sigue siendo través de llamadas por telefonía regular.

Finalmente, los resultados obtenidos se tabularon y se analizaron las frecuencias de respuestas de las cinco fincas encuestadas, como se detalla en resultados y discusión.

2.3.4. Apoyo al equipo interdisciplinario del proyecto “Evaluación del grado de contaminación con antibióticos en felinos silvestres y sus hábitats en los parques nacionales Braulio Carrillo, Tortuguero y Los Quetzales”

Como parte del contexto alrededor de la pandemia por la COVID-19 fue necesario alcanzar el cumplimiento de los objetivos a través de actividades realizadas de forma remota, ya que las reuniones presenciales no eran la opción más segura para trabajar. De esta forma se decidió desarrollar tres infografías a partir de la información obtenida y analizada de las encuestas y las giras de campo hechas durante la pasantía.

Se procesó la información de forma resumida para crear el material gráfico dirigido a personas estudiantes de la carrera de Licenciatura en Medicina Veterinaria y afines, sobre la integración de la perspectiva veterinaria en el enfoque “una salud” utilizando las experiencias surgidas a partir del proyecto “Evaluación del grado de contaminación con antibióticos en felinos silvestres y sus hábitats en los parques nacionales Braulio Carrillo, Tortuguero y Los Quetzales” como ejemplo práctico.

La realización de estas infografías requirió el apoyo de la Bach. Relaciones Internacionales, UNA, Brenda Zamora Rojas, en el desarrollo del diseño gráfico, y de

la Bach. Sociología, UNA, Mariela Montero Arias, en la contextualización de la información que fue obtenida.

2.3.5. Planteamiento y diseño de un bioensayo multinivel

Se participó de un bioensayo multinivel (Figura 2) en el que se expusieron alevines de guapote (*Parachromis dovii*) a una mezcla de Difenconazol (DFZ) con Clorpirifós (CPF).

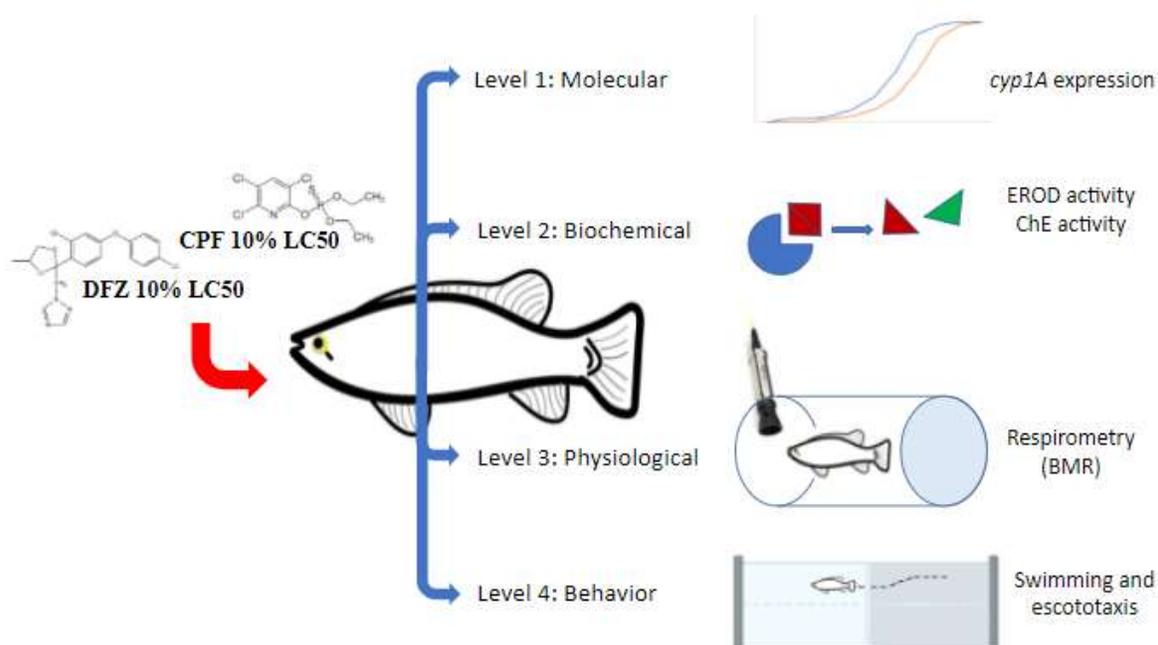


Figura 2. Esquema de la evaluación multinivel del bioensayo realizado durante la pasantía en IRET-UNA, Heredia, Costa Rica.

Tomado de Redondo et al., 2021.

Durante este bioensayo se evaluaron los cambios en cuatro niveles distintos entre el grupo control y el expuesto a la mezcla:

1. Posible cambio a nivel molecular (Inducción de la transcripción de CYP1A)

2. Cambios bioquímicos (enzimas evaluadas)
3. Cambios fisiológicos (determinación de tasas metabólicas basales)
4. Cambios en natación y comportamiento de los peces.

El grado de responsabilidad y participación en cada una de las etapas fue variable y está especificado en el apartado correspondiente. Al finalizar el bioensayo, se procedió a realizar el análisis de los datos obtenidos.

2.3.6. Preparación de soluciones de exposición

Los peces *P. dovii* fueron expuestos a una mezcla con CPF y DFZ. La solución stock de DFZ fue preparada de la siguiente manera: 2722 $\mu\text{g/mL}$ de la sustancia disueltos en acetona. De esta, se tomaron 95.51 μL con una micro jeringa y fueron adicionados directamente a un recipiente con 800 mL de agua filtrada (1 μm) y tratada con carbón activado y luz UV (Milipore) en adelante indicada como agua UV. Por su parte, la solución stock de CPF consistía en 2581.3 $\mu\text{g/mL}$ de dicho insecticida disuelto en acetona. Para dispensar la cantidad requerida, fue necesario realizar una solución intermedia: se tomaron 5 μL de la solución stock de CPF y se agregaron 95 μL en agua UV. De la solución intermedia se tomaron 33 μL y se agregaron directamente al mismo recipiente con 800 mL que ya contenía al difenoconazol.

Para comprobar la presencia de estas disoluciones en el agua, se requirió su cuantificación en el LAREP. Dicho proceso fue realizado por la MSc. Karla Solano Díaz, ingeniera química, por medio de una extracción en fase sólida (cartucho Waters Oasis® HLB, 60 mg 3CC) y del análisis del extracto con cromatografía líquida acoplada

a detector de masas, usando un sistema Acquity UPLC Waters, acoplado a espectrómetro de masas Xevo TQ-S micro (triple cuadrupolo) tandem.

2.3.7. Preparación del bioensayo

Cada día se tomaron, de forma aleatoria, dos peces del tanque de peces del IRET. Los mismos se colocaron individualmente en contenedores de vidrio con 800 mL de agua UV y se mantuvieron con aireación constante, fotoperiodo natural (12:12) y con una temperatura del agua de 22.54 ± 0.96 °C. En total se realizaron diez réplicas utilizando en un frasco un pez control y en otro, uno expuesto a la mezcla con DFZ (325 µg/L) y CPF (5.5 µg/L) durante 48 h. Para la preparación del animal expuesto a plaguicidas, se tomaron alícuotas de ambas sustancias y se agregaron a los envases antes de introducirlo. Los peces no fueron alimentados durante el ensayo.

2.3.8. Procesamiento de tejidos y cuantificación de proteínas

Posterior a las pruebas de respirometría y comportamiento se realizó la eutanasia de los peces para seguidamente, diseccionarlos. Se tomaron las muestras de cerebro (órgano entero) y músculo lateral (una muestra de aproximadamente 50 mg), que fueron colocadas en microtubos e inmediatamente almacenadas a -80°C para medir la actividad de ChE. El hígado fue extraído y se dividió por la mitad. Una de las mitades se colocó inmediatamente -80°C para la medición de EROD y la otra fue almacenada en RNAlater ® y almacenada a -80°C para la identificación y cuantificación de la transcripción de *cyp1A*. Durante todo el procesamiento de las muestras fue necesario respetar la cadena de frío.

2.3.9. Determinación de EROD y ChE en muestras de peces *P. dovii*

2.3.9.1. Determinación de EROD

La actividad de la enzima etoxi-resorufina desetilasa (EROD) fue determinada de acuerdo con el método descrito por Peters y colaboradores (1994), con algunas modificaciones y adaptado a microplaca de acuerdo con Jiménez (2019). Se preparó una curva de resorufina, que es el producto de la reacción enzimática. La ecuación lineal que describe esta curva fue utilizada para estimar el producto generado en la reacción de las muestras (Cuadro 1).

Cuadro 1. *Determinación de EROD: Preparación de la curva de resorufina, en un experimento realizado durante la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica.*

| <u>Volumen Buffer en μL</u> | <u>Concentración Resorufina</u> | <u>Volumen de solución 1000 nM en μL</u> |
|---|---------------------------------|--|
| 990 | 10 | 10 |
| 980 | 20 | 20 |
| 960 | 40 | 40 |
| 920 | 80 | 80 |
| 840 | 160 | 160 |

En total se analizaron 20 muestras de hígado, las cuales fueron homogenizadas en 300 μL de una solución buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M (pH=7.4) con un sonicador Branson, *SLPt*. El homogeneizado resultante fue centrifugado a 15300 g y a 4° C durante 20 min. El sobrenadante fue utilizado para las mediciones de las actividades enzimáticas.

Las muestras de cerebro fueron homogeneizadas en 400 μL buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M (pH=7.2) y centrifugadas por cinco min a 10600 g, 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron de la siguiente manera: 100 μL de sobrenadante en 200 μL de buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M (pH=7.2). El sobrenadante se guardó a -80 °C.

Las muestras de músculo se homogeneizaron en 800 μL de buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M (pH=7.2) y se centrifugaron por cinco min a 10600 g, 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron de la siguiente manera: 40 μL de sobrenadante en 240 μL de buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M (pH=7.2). El sobrenadante se guardó a -80 °C.

En todos los tejidos procesados, el contenido de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford (1976) con un reactivo marca *BIO-RAD*[®]. Como estándar se utilizó una curva de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés). La medición se realizó en una microplaca y la lectura se llevó a cabo a 595 nm cinco min después de mezclar. El contenido de proteína en las muestras fue calculado con la ecuación lineal obtenida para la curva de BSA.

La curva de Resorufina fue preparada a partir de una solución stock de 50 μM de resorufina en MeOH, preparada el 18-02-18 y mantenida a 4 °C. Se realizó una dilución de la solución del stock 1/50 para tener una solución de 1000 nM. Para ello, se adicionaron 20 μL de solución stock de resorufina a 980 μL . A partir de esta solución de 1000 nM, se realizó la preparación de la curva (Cuadro 1): la solución de reacción consistió en 20 mL de un buffer fosfato de 0.1 M con pH 7.4 adicionado a 200 μL de NADPH (0.10 Mm) y 500 μL de 7- etoxi-resorufina (7-ER) (0.415 μM). La cinética de la reacción fue medida en microplacas durante tres min en un Thermo Scientific™

Fluoroskan™ fluorómetro con filtros de 530 nm (excitación) y 580 nm (emisión). La unidad de actividad de EROD fue definida como la formación de 1 nmol de resorufina por min por mg de proteína.

2.3.9.2. Determinación de ChE

La actividad de las colinesterasas se hizo siguiendo el método de Ellman (1961), adaptado a una microplaca según Guilhermino y colaboradores (1996). La solución de reacción se compone de buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M (pH=7.2), acetilcolina 1 Mm como sustrato sintético y dithiobis-2 ácido dinitrobenzoico (DTNB) 5.5 mM, 0.1 mM como agente cromogénico, midiendo la cinética a 405 nm cada 2.5 min durante diez min. La actividad fue expresada como nmol por min por mg de proteína.

2.3.10. Pruebas de RT-PCR

Todas las muestras de hígado fueron inmersas en RNAlater (QIAGEN, Alemania) y mantenidas en un congelador -80°C hasta su procesamiento. Antes de llevar a cabo los análisis, se retiró el RNAlater. Para ello, se les centrifugó a alta velocidad y se descartó el sobrenadante. Los ARN de las muestras de hígado fueron extraídos utilizando Pure Link™ RNA mini kit (Invitrogen, USA) y tratados con DNase I, RNase free (Novagen, USA). El proceso de retrotranscripción se llevó a cabo utilizando el RevertAid RT-Kit (Thermo Scientific, USA). Durante todo el proceso se siguieron las indicaciones brindadas por los fabricantes.

Los genes *cyp1A* y β -actina fueron detectados utilizando PCR en tiempo real (RT-PCR). Las muestras se consideraron válidas cuando mostraron un umbral de ciclo (ct) inferior a 30. La cuantificación de los genes se realizó de acuerdo con el método y

los primers utilizados por Navarro y colaboradores (2014). La abundancia relativa de transcritos de mRNA de *cyp-1A* fue estimada utilizando β -actinas como gen de referencia, siendo representada como número de copias de ARNm de *cyp1A* por 1000 copias de β -actina.

2.3.11. Pruebas de Tasa Metabólica Basal

Tanto las pruebas de respirometría como las de comportamiento estuvieron a cargo del Bach. Sergei Redondo, a quien se le asistió durante el proceso. Este procedimiento fue realizado de acuerdo con Sandoval-Herrera y colaboradores (2019). Después de 48 h de ensayo, cada pez fue colocado en una de dos cámaras de respirometría (A o B). Cada una tenía un volumen de agua interno de 727 mL y en cada repetición se aseguró que aquella que contuviera al pez expuesto a los plaguicidas se alternara entre la cámara A y B, para prevenir alteraciones en los resultados dadas a las diferencias propias de ellas.

Una vez que cada pez fue colocado dentro de la cámara, permanecía un periodo de dos h con el sistema abierto (con circulación de agua UV saturada de oxígeno disuelto desde un reservorio externo) y cubierto con una manta oscura protectora para disminuir el estrés durante la aclimatación. Posterior a este tiempo, el sistema se cerró por lo que dentro de la cámara recircularía el agua contenida. Inmediatamente se tomó el primer dato sobre oxígeno disuelto en agua, considerado como inicial. Posteriormente, se tomaron estos datos cada cinco min durante 40 min. La temperatura se mantuvo a 22.08 ± 0.75 °C.

Las tasas metabólicas basales (TMB) fueron estimadas en los peces al finalizar el ensayo, de acuerdo con lo indicado por Sandoval-Herrera y colaboradores (2019) con algunas modificaciones, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{TMB} = \left[\frac{\text{mg O}_2}{\text{g} \cdot \text{h}} \right] = \left[\frac{\text{Pendiente} [\text{Consumo de Oxígeno}(\text{mg})/\text{L} \cdot \text{h}] \cdot V (\text{L})}{\text{Peso del pez}(\text{g})} \right]$$

2.3.12. Evaluación del comportamiento

El comportamiento de escototaxis (preferencia de zonas oscuras) fue evaluado según el protocolo de Maximino y colaboradores (2010), adaptado por Sandoval-Herrera y colaboradores (2019). La prueba consistió en dos tanques de vidrio de 20 L con 40 cm largo x 25 cm alto x 20 cm ancho rellenas con agua UV. Uno de los tanques presentaba una mitad blanca y otra negra (configuración clara-oscura), en tanto que el otro tenía sus dos mitades de color blanco (configuración claro-claro), actuando como control de la prueba claro-oscuro (Figura 3).

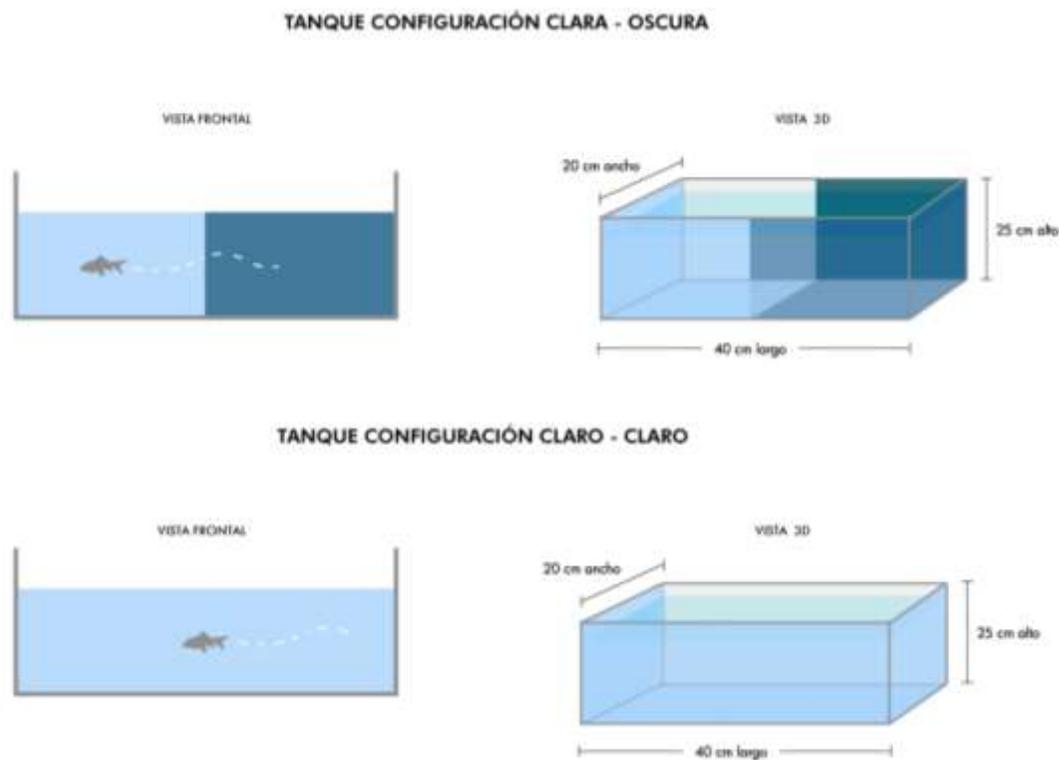


Figura 3. Configuración de los tanques con agua UV para las pruebas de escototaxis, durante la pasantía en el IRET, UNA. Heredia, Costa Rica. Elaboración propia.

Antes de comenzar el procedimiento, el pez fue colocado en el centro del tanque entre dos capas (correspondientes al color de cada compartimento según la configuración de luminosidad) por cinco min para que se habituara. Posteriormente, se retiraron estas capas y se documentó el comportamiento con una webcam que tomaba 30 imágenes por minuto.

Los videos fueron analizados utilizando el programa OpenCV Library en Python (OpenCV 2022). Las coordenadas (X/Y) del pez fueron extraídas de cada imagen del video cada 0.07 s. Estas coordenadas fueron utilizadas para llevar a cabo tres análisis:

1. La locomoción del pez fue evaluada utilizando el desplazamiento total, vertical, horizontal y el uso de las áreas superficiales y profundas del agua (calculadas al dibujar una línea imaginaria horizontalmente en el medio de la columna de agua).
2. Análisis del comportamiento (escototaxis) según el tiempo que el pez permaneció en el área más oscura del tanque (calculado por el dibujo de una línea vertical imaginaria en el centro del tanque).
3. Los patrones de movimiento fueron dibujados y analizados mediante el programa de visualización de datos: ParaView (ParaView 2022).

2.3.13 Análisis estadístico del bioensayo

Se analizó la normalidad de todos los resultados moleculares, fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento mediante la prueba Shapiro. En los casos que los datos cumplieran con una distribución normal se procedió a realizar una prueba T paramétrica para comparar los resultados de los peces del grupo control con los peces del grupo tratado. Para los casos en los que los datos no presentaban una distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica Wilcoxon para realizar la comparación entre grupos.

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significantes cuando el valor de p fue inferior a 0,05. Los análisis fueron realizados con R v3.6.1 en su totalidad (R Core Team 2020).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la realización de la pasantía se suscitó la pandemia relacionada a la COVID-19. Esta obligó a realizar modificaciones importantes de las actividades previstas. Por ello, muchas cualidades necesarias para ser eficiente en la actualidad fueron puestas a prueba, por ejemplo: la capacidad de adaptación, innovación y la reformulación metodológica tanto para el trabajo individual como para el trabajo en equipo, tomando en consideración la adecuación de las actividades para poder llevarlas a cabo de forma remota siempre que fuera posible (Oszlak, 2020) en un contexto en el cual compartir de forma física con otras personas significaba un eventual riesgo importante para la salud de cada persona y para la dinámica epidemiológica de la enfermedad en el país.

A continuación, se describen los principales resultados según el cumplimiento de cada objetivo específico planteado.

3.1. Primer objetivo

Se trabajó con el instrumento de estudio empleado en el proyecto “Evaluación del grado de contaminación con antibióticos en felinos silvestres y sus hábitats en los parques nacionales Braulio Carrillo, Tortuguero y Los Quetzales”. Este material permitió obtener información sobre aspectos generales de la finca, especies productivas y domésticas presentes, prácticas de manejo de las personas productoras, manejo de desechos, eventos de enfermedad en animales, uso de medicamentos, asesoría veterinaria, uso de plaguicidas y abonos, aspectos de salud ocupacional y casos de depredación.

Parte del trabajo previo a la recopilación de datos en el campo se colaboró en el transporte de las encuestas a un software de acceso libre. La utilidad de transportar las encuestas utilizadas al software gratuito ODK recae en que este permite reemplazar los formularios físicos, registrándose los datos de manera virtual, sin necesidad de conexión inmediata a redes móviles o wifi disponibles durante las labores de campo. El programa brinda la facilidad de incorporar geolocalizaciones, clips de audio y video, fotografías, códigos de barras y otros elementos que pueden ayudar a complementar y ampliar la información obtenida a través del instrumento de estudio (ODK 2020).

Debido a que se trata de un software libre, trabajar a través de este sugiere una mayor versatilidad, no solo al momento de la toma de datos sino también en su posterior análisis, ya que facilita compartir la información con otros usuarios si así se desea y el análisis conjunto de toda la información obtenida en el trabajo de campo (ODK 2020). También, el programa permite la accesibilidad de los datos, incluyendo los multimedia para otros investigadores o interesados que se encuentren en otras zonas geográficas, facilitando de esta manera los procesos de retroalimentación y dando aportes importantes que fortalezcan y contribuyan de alguna manera a la denominada ciencia ciudadana y al desempeño en equipos de investigación que deban trabajar de forma remota. Así mismo, se da un paso de transformación de la información entre la sociedad actual y la del conocimiento, que favorezca una mayor participación de la ciudadanía en los procesos científicos y de esta manera, una mayor comunicación y divulgación de los hallazgos obtenidos. Con ellos, se procura que la

ciencia aumente cada vez su impacto positivo en la construcción social (Caamano y Pascale 2014).

Fue posible realizar tres encuestas a través de giras de campo a fincas ubicadas en zonas cercanas al Parque Nacional Los Quetzales y dos más por medio de llamadas telefónicas a fincas aledañas al Parque Nacional Tortuguero. Consecuentemente, con las políticas de privacidad y protección de datos del proyecto “Evaluación del grado de contaminación con antibióticos en felinos silvestres y sus hábitats en los parques nacionales Braulio Carrillo, Tortuguero y Los Quetzales” en este trabajo se utilizan seudónimos para hacer referencia a las fincas y las personas encuestadas. Las encuestas realizadas de forma presencial tuvieron una duración alrededor de 1:30 h mientras que las realizadas por teléfono tuvieron una duración menor (Cuadro 2).

Cuadro 2. *Información general de las fincas encuestadas aplicadas durante la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica.*

| <u>Persona Encuestada</u> | <u>Identificación de la finca</u> | <u>Ubicación</u> | <u>Metodología</u> | <u>Duración</u> |
|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------|-----------------|
| Don Mario | Finca truchas | de Copey, Dota, San José | Gira de Campo | 1:30 h |
| Doña Satya | Las Vueltas | Copey, Dota, San José | Gira de Campo | 1:25 h |
| Don Carlos | CS | Copey, Dota, San José | Gira de Campo | 1:30 h |
| Don Juan Carlos | Ceci | Tortuguero, Limón | Llamada Teléfono | 39 min |

| | | | | |
|-----------|----------|-------------------|---------------------|-----|
| Don Pedro | Familiar | Tortuguero, Limón | Llamada Teléfono | 1 h |
|-----------|----------|-------------------|---------------------|-----|

En el cuadro anterior se pueden observar las diferencias en la duración de las encuestas de forma que aquellas realizadas de forma presencial se llevaron a cabo en 1.28 h en promedio, mientras que las realizadas de forma remota tardaron 50 min, a pesar de que a todos los y las entrevistados se les aplicó el mismo instrumento de investigación. La diferencia se debió a que de forma presencial los encuestados dieron respuestas más amplias, prestaron más atención al proceso, fueron menos interrumpidas por otras personas presentes en el sitio durante la entrevista y mostraron menos apuro por terminar rápidamente la entrevista (Abascal y Grande 2005).

Las fincas encuestadas fueron muy variadas en sus actividades productivas, desde una piscícola (Finca de truchas) hasta una de autoconsumo y actividades turísticas para su propio hostel (Las Vueltas). Además, tres fincas se dedicaban principalmente al ganado bovino: una de ellas elabora productos lácteos y dos se dedican a la producción extensiva de carne. Las últimas se ubicaban en la zona de Tortuguero. También se encontraron animales presentes en las fincas que no se dedicaban a la actividad productiva principal, ya que en cuatro de las cinco fincas encuestadas dijeron tener mascotas en el sitio u otros animales para autoconsumo, entre esos gallinas, cabras, ovejas, abejas, cerdos, entre otros. Todas las fincas eran emprendimientos familiares (Cuadro 3).

Cuadro 3. *Distribución de animales en las fincas encuestadas, durante la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica.*

| <u>Nombre de la finca</u> | <u>Actividad Productiva Principal</u> | <u>Número de Animales</u> | <u>Otros Animales Presentes</u> | <u>Número de Animales</u> |
|---------------------------|---|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Finca de truchas | Filete de Trucha | 13 estanques | Ninguno | 0 |
| Las Vueltas | Autoconsumo. Productos Lácteos y cárnicos Bovinos | 6 bovinos (en ordeño) | Cerdos | 2 |
| | | | Gallinas | 15 |
| | | | Patos | 3 |
| | | | Cabras | 5 |
| | | | Perros | 5 |
| | | | Gatos | 4 |
| | | | Yegua | 1 |
| | | | Abejas | 1 Colmena |
| | | | Truchas | 1 estanque |
| CS | Productos Lácteos | 11 bovinos (en ordeño) | Perro | 1 |
| Ceci | Carne (Cría) Bovina | 15 bovinos | Cerdos | 1 |
| Familiar | Carne (Cría) Bovina | 86 bovinos | Gallinas | 15 |
| | | | Ovejas | 5 |
| | | | Cabras | 9 |
| | | | Perros | 6 |
| | | | Caballos | 2 |

Las giras de campo le brindan la oportunidad a un o una investigadora correctamente capacitada observar la rutina de los y las trabajadoras durante los procesos de producción y el manejo de los animales. A través de la observación del

sitio y de cómo los encuestados llevan a cabo los procesos, se puede diferenciar durante la recolección de datos qué respuestas del cuestionario realizado están basadas en la autopercepción del encuestado y qué respuestas se acercan más a la realidad técnica sobre lo que se lleva a cabo en la práctica (Galeano 2018). Por ejemplo, dos personas encuestadas indicaron no tener medicamentos vencidos en su botiquín. Sin embargo, durante las giras de campo se realizó una inspección visual de los dos botiquines y se encontraron medicamentos vencidos en ambos.

Así mismo, las y los encuestados por vía telefónica sugirieron ocasionalmente que “para darse a entender mejor” recomendarían que se visitara la finca, ya que para ellos sería más sencillo mostrar los procesos en el lugar con los animales allí.

También es importante resaltar que el recurso anecdótico fue comúnmente utilizado para expresar más fácilmente sus ideas y este se ve favorecido durante los recorridos guiados, ya que ahí recuerdan situaciones de enfermedad que tuvieron ciertos animales, lugares o momentos en específico que brindan mucha información casual sobre el problema en investigación (Abascal y Grande 2005).

Durante la ejecución del cuestionario es importante no interrumpir a la persona encuestada mientras habla, mantener una expresión facial inmutable mientras anota sus respuestas y no pretender corregir a la persona constantemente. La familiarización con la persona encuestada puede ser una herramienta muy útil para obtener respuestas sinceras en el cuestionario. Esto se logra siendo amable y conciso, hablando en un lenguaje que la persona no solo entienda, sino que además le parezca familiar, expresando empatía por los problemas y dificultades que presenta en la finca,

ejerciendo una actitud libre de juicio sobre sus acciones o decisiones en el manejo con animales y administración de su finca. Durante la recolección de datos se desea generar un ambiente de libertad de expresión para que el entrevistado pueda brindar los datos más acercados a la realidad como sea posible, sin que sienta vergüenza, miedo a ser juzgado o a mentir, pensando que se trata de algún tipo de evaluación sobre su trabajo (Abascal y Grande 2005).

Una dificultad sanitaria al momento de realizar las encuestas de forma presencial se dio debido a la necesidad de acercamiento y servicio, propio de la idiosincrasia de las personas provenientes de zonas rurales del país con aquellos a quienes consideran “visitas” (invitados) en sus hogares o sitios de trabajo. De esta forma, en todos los recibimientos fue común la insistencia, en múltiples ocasiones, por realizar la entrevista mientras se toma café con algún refrigerio típico de la zona.

Debido a que el distanciamiento físico no es aún un concepto colectivamente interiorizado, los entrevistados inconscientemente se acercaban más de lo recomendado y utilizaban erróneamente la mascarilla (Ministerio de Salud 2021), ya que conforme avanzaba la encuesta, intermitentemente bajaban la mascarilla al mentón o se descubrían la nariz para lo que ellos consideraban “respirar mejor”. Otra dificultad es que en los alrededores había individuos ajenos al proceso de entrevista que no utilizaban tapabocas.

Se identificaron 14 factores de riesgo sobre fuentes de contaminación ambiental con antibióticos. Algunos de estos consisten en condiciones que predisponen a los productores a realizar prácticas agropecuarias indebidas y otras son acciones

concretas que resultan peligrosas para la salud de los animales de producción, la salud ambiental y de los humanos (Cuadro 4).

Cuadro 4. *Identificación de los riesgos asociados a la contaminación de antibióticos hacia el medio ambiente mediante las encuestas realizadas en la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica.*

| <u>Riesgo asociado a fuentes de contaminación de antibióticos hacia el medio ambiente</u> | <u>Observaciones</u> | <u>Frecuencia</u> |
|---|--|-------------------|
| Animales toman agua de ríos y quebradas | Al mismo tiempo los animales pueden defecar y orinar en el agua | 1 |
| Aplicación de gallinaza no certificada en potreros | La utilizan como abono al momento de siembra del pasto | 1 |
| Reutilización de Jeringas y agujas | Se indicó un uso de hasta 5 veces | 1 |
| Indebido descarte de jeringas y agujas | Material se entierra en el campo | 1 |
| Inadecuado descarte de leche con trazas antibiótico | Se descarta botándola al exterior | 1 |
| Presencia de otros animales | Compartiendo espacios cercanos se encuentran otros animales de producciones secundarias o mascotas | 3 |
| Deposiciones de mascotas cerca de áreas naturales | Mascotas andan libres en la finca y en zonas boscosas acompañados de sus dueños | 3 |
| Insuficiente asesoramiento con médicos veterinarios | No reciben visitas frecuentes ni consideran necesaria su visita en todos los casos para aplicar tratamientos y procedimientos a sus animales | 5 |
| Medicación empírica de animales | Tratan por sí mismos a sus animales en los eventos de enfermedad más comunes | 5 |

Cuadro 5. *Identificación de los riesgos asociados a la contaminación de antibióticos hacia el medio ambiente mediante las encuestas realizadas en la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica.*

| <u>Riesgo asociado a fuentes de contaminación de antibióticos hacia el medio ambiente</u> | <u>Observaciones</u> | <u>Frecuencia</u> |
|---|--|-------------------|
| Botiquín sin seguridad | Pueden accederse libremente ya que no cuentan con ninguna seguridad | 4 |
| Botiquín con presencia de medicamentos vencidos | Se observaron o fueron indicados por la persona encuestada | 3 |
| Desconocimiento sobre función medica de antibióticos | La autopercepción de los encuestados es de conocer la función de los medicamentos, pero a través de sus ejemplos y usos se observa no ser correcto | 3 |
| Desconocimiento de la Guía de Buenas Prácticas Agropecuarias del MAG | Tienen desconocimiento sobre su contenido o existencia. | 4 |
| Depredación de animales | Han sufrido depredaciones en el último año | 5 |

Dos de las cinco personas encuestadas indicaron que su ganado bovino bebe agua directamente de ríos y quebradas, lo que representa un peligro para la salud ambiental y la inocuidad del agua ya que llega a contaminarla con deposiciones fecales y orina de forma directa. También sucede una contaminación más difusa del agua si estas deposiciones se realizan en las periferias de estas fuentes (Auquilla 2005; Tubay 2020).

La contaminación debido al aumento en la carga de bacterias entéricas en el agua por parte del ganado puede tratarse de una forma de diseminación de bacterias con resistencia antimicrobiana (Rivera y Cedillo 2005; Colomer et al. 2011; Ramey y Ahlstrom 2020). Además, debe considerarse que algunos de estos animales en ocasiones pueden contar con tratamientos que incluyan administración de antibióticos, los cuales son excretados por las heces o la orina (Timofeeva y Bodienkova 2021).

En un estudio realizado en el 2005 en la subcuenca del río Jabonal en Esparza, Costa Rica, en el que se evaluó la variación en la calidad del agua y su relación con los distintos usos de suelo, se determinó que los cambios respondieron al uso de suelo en las fincas ganaderas: los potreros, establos y asentamiento humanos fueron los mayores contribuyentes a la contaminación. Ahí se llevó a cabo un conteo de coliformes totales muy elevado en sitios donde había presencia de ganado en pastoreo con libre acceso a los cauces (Auquilla 2005). A pesar de que estos indicadores bacteriológicos de la calidad sanitaria del agua no son considerados los mejores, sobre todo en el trópico, sí estuvieron presentes en niveles mayores que los recomendados por la OMS (Auquilla 2005).

En el estudio anterior también se reportó un aumento de coliformes fecales (actualmente denominadas por la OMS como coliformes termotolerantes) en aguas subterráneas de las nacientes y el bosque en zonas sin protección de las quebradas. Sus valores sobrepasaban los niveles máximos permitidos para aguas superficiales de consumo humano en Costa Rica (Auquilla 2005; OMS 2006). Es importante mencionar la presencia de *Escherichia coli* es una prueba concluyente de contaminación fecal reciente (OMS 2006).

Es posible que se den casos de contaminación con antibióticos y enterobacterias multirresistentes de forma similar al caso anterior cuando, por ejemplo, se les permite a las mascotas transitar por los bosques o las zonas aledañas a estos, en ocasiones sin acompañamiento de sus dueños. Dicha práctica facilita que los animales defecuen donde consideren y que sus heces no sean recogidas. Este riesgo se identificó en tres de las cinco fincas encuestadas. Las mascotas, al defecar en la superficie del suelo o riachuelos, pueden convertirse en vectores de bacterias hacia el medio ambiente que cuenten con genes de resistencia antimicrobiana (Puvaca y Llanos Frutos 2021; Yang et al. 2022).

Dado que los animales de compañía comparten con otras especies animales en las fincas llegan a tener contacto con las heces de estos e incluso, otros animales silvestres. A partir de la encuesta fue reportada la ingesta de boñiga por parte de algunos perros y fue indicado que a estas mascotas les permiten el contacto con la naturaleza y el interior de los hogares. También es factible que sus dueños les den antibióticos sin prescripción médica (Ramey y Ahlstrom 2020; Yang et al. 2022). La dinámica descrita contiene varios de los riesgos que se han identificado en este trabajo y se relacionan entre sí a partir del manejo de las mascotas, poniendo en evidencia la importancia de indagar más sobre este tema para dar recomendaciones oportunas sobre el manejo de las mascotas, el cual es emocionalmente distinto para sus dueños en comparación con el manejo de los animales de producción con los que conviven (Yang et al. 2022).

Otro riesgo reconocido fue la utilización de gallinaza no certificada como abono de origen animal al momento de siembra del pasto para obtener mejores rendimientos

del cultivo. Aunque el uso de gallinaza puede llegar a ser una práctica positiva ya que favorece el reciclaje de nutrientes y materia orgánica, no se puede utilizar en todos los cultivos aún menos sin antes haberla procesado correctamente a través de un tratamiento térmico y sin que tenga una certificación que avale su calidad inocua. El riesgo consiste en la elevada cantidad de bacterias entéricas contenidas en el abono, las cuales van a diseminarse por todo el suelo. Así, diferentes animales pueden llegar a estar en contacto con agentes potencialmente patógenos (Bohórquez 2020). También es importante tomar en cuenta que estos subproductos, vendidos de forma informal, pueden provenir de producciones avícolas con usos irracionales de antimicrobianos (Bohórquez 2020; Cruz 2020). Estudios recientes han determinado que la aplicación de estos abonos producidos de forma tradicional sí incrementa las densidades de bacterias entéricas resistentes a antibióticos en el suelo, así como los genes de resistencia respectivos. Esto puede implicar una vía de diseminación de estos genes a través de la cadena alimenticia y un contaminante altamente persistente en el suelo (Bohórquez 2020; Cruz 2020).

La presencia heterogénea de especies animales domésticas y de producción compartiendo espacios comunes implica un riesgo de infección entre ellas, así como el transporte mecánico de agentes patógenos de un sitio a otro. También aumenta el riesgo de presentar plagas de animales como roedores cerca de los alimentos, concentrados y equipos utilizados. Algunos agentes patógenos importantes que considerar pueden ser: *Salmonella* spp. en aves, *Neospora* spp. en caninos, *Leptospira* spp. en roedores y *E. coli* en diferentes especies, entre otros (Paris et al. 2011; Ramey y Ahlstrom 2020). De las fincas encuestadas, tres contaban con la

presencia de otros animales en zonas cercanas o compartidas con las destinadas a su actividad productiva principal. Por todo lo anterior, es preciso indagar más sobre la percepción de las personas productoras con relación a la interacción de animales de distintas especies y los riesgos asociados que esto conlleva.

En el caso de la reutilización de agujas y jeringas en un hato bovino para aplicar diferentes medicamentos, la persona indicó reutilizarlas hasta un máximo de cinco veces, ya que, a su parecer, posterior a esta cantidad, las agujas y jeringas se quiebran. La mala práctica en el uso de jeringas implica distintos riesgos, algunos de los cuales son: transmisión iatrogénica de enfermedades y agentes patógenos entre los animales, por ejemplo, virus de leucemia bovina, virus de diarrea viral bovina, virus de lengua azul, hemoparásitos y distintas bacterias, entre otros (Darpel et al. 2016). Además, favorece la producción de abscesos en los sitios de inyección, lo que induce fallas terapéuticas. También puede ocasionar que se contamine el vial que contiene el medicamento multidosis al insertar dentro del vial una aguja no estéril, potenciando el crecimiento bacteriano dentro de él e incrementando la posibilidad de inocular otros animales con estas bacterias cada vez que se hace uso del medicamento (Eltaj 2010).

Una aguja contaminada puede funcionar como un vector mecánico de distintas bacterias. En un estudio previo se encontró una mayor cantidad de contaminación bacteriana en viales multidosis de medicamentos de uso veterinario que en el promedio de uso humano. Algunos de los fármacos contaminados fueron: desparasitantes, multivitamínicos, antiinflamatorios, entre otros. Entre las bacterias identificadas se hallaban: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermitis*, entre otras (Eltaj 2010).

Enterrar agujas y jeringas en el campo (acción identificada en una finca encuestada) es una práctica impropia que implica un alto riesgo físico y microbiológico para la salud ambiental y de las personas. Este material punzocortante puede ser descubierto por los animales que excavan, la tierra que los recubre podría ser lavada por las lluvias o incluso estar ubicada en sitios inundables, contaminando las fuentes de agua. De igual forma, el material médico puede servir como vía de transmisión de distintos agentes patógenos y causar lesiones percutáneas que sirvan de entrada para agentes patógenos en animales y humanos (OMS 2018). A través de estas lesiones, los animales silvestres, de producción y hasta los mismos trabajadores corren el riesgo de entrar en contacto con trazas de medicamento, virus o bacterias siguiendo una cadena de exposición similar a la indicada en el caso anterior.

En una de las cinco fincas encuestadas el productor indicó verter la leche de descarte en el suelo. En ocasiones, el líquido proviene de vacas con mastitis agudas o crónicas que han sido tratadas con antibióticos. Esta mala práctica se une a la de no respetar los tiempos de retiro, utilizar medicamentos no aprobados para vacas lecheras, la carencia de registros de medicación, la aplicación de medicamentos sin la prescripción de un médico veterinario, la administración de sobredosis de medicamentos o por vías no recomendadas y al descarte únicamente de la leche del cuarto mamario tratado con antibiótico, entre otras (Mattar et al. 2009).

La leche vertida al suelo podría ser ingerida por otros animales domésticos, silvestres o roedores, los cuales pueden enfermar por los agentes patógenos que contiene la leche. También pueden ser expuestos a bacterias con distintos perfiles de sensibilidad antibiótica y a antibióticos en subdosis, ocasionándose un indebido

desequilibrio en el microbiota de los animales y la proliferación de cepas resistentes (Arenas y Moreno 2018).

Con relación al botiquín y su respectivo almacenamiento de medicamentos: una finca no contaba con él, mientras que las restantes cuatro sí. En general, estaban ubicados en sitios de fácil acceso para todos los trabajadores, no se encontraban bajo llave, incluso una persona encuestada indicó que estaba dentro de la refrigeradora de la casa de su familia. Esta es una práctica inconveniente ya que no deberían estar al alcance de todas las personas, pues se dificulta aún más llevar un control sobre su uso, así como puede haber una contaminación cruzada de los alimentos a los medicamentos que están en la refrigeradora o viceversa.

Con respecto al uso de antibióticos, cuando se les pidió nombrar uno utilizado en su finca, los encuestados solo podían recordar el nombre de uno o máximo dos. Seguidamente, tres personas indicaron además nombres de medicamentos o compuestos activos que no eran antibióticos, por ejemplo, Tolfen L.A (ácido tolfenámico, antiinflamatorio), también relataron situaciones o casos de enfermedad en los que han aplicado antibiótico, en dichos casos su uso ha sido incorrecto. Como por ejemplo cuando han observado animales “tristes”, cuando dejan de comer o si les parece que tienen calentura o anemia, entre otras.

En general la familia de antibióticos más utilizada por los encuestados fueron miembros de las tetraciclinas seguidos de los betalactámicos. No se encontraron antibióticos de las familias de aminoglucósidos, sulfonamidas ni macrólidos. Los antibióticos más nombrados fueron Emicina® (oxitetraciclina) y penicilina, ambos

fueron indicados por tres personas, seguido de Baytril® (enrofloxacin), nombrado por una persona.

El medicamento Emicina® seguido de la penicilina fue también el más indicado durante una investigación realizada en fincas de las mismas zonas, esto quiere decir que al menos desde entonces hay personas productoras que siguen utilizando indefinidamente estos medicamentos como sus fuentes antibióticas de elección (Rojas 2019).

Las tetraciclinas son utilizados solos o en combinación con otros antibióticos para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias Gram negativas, Gram positivas, intracelulares y algunas infecciones por protozoarios. Sin embargo, también es utilizado en casos clínicos en los cuales no se ha comprobado que haya un proceso infeccioso y de forma profiláctica para la prevención de *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, entre otras (Roberts 2005). Al ser antibióticos de amplio espectro que resultan de bajo costo han sido ampliamente usados en medicina veterinaria y humana. Sin embargo, se ha reportado una creciente resistencia antimicrobiana frente a esta familia antibiótica (Chopra y Roberts 2001; Roberts 2005).

Por su parte, la familia de los betalactámicos son el grupo más utilizado mundialmente, el cual en ocasiones ha llegado a corresponder al 50% de los antibióticos indicados en recetas médicas. Sin embargo, las bacterias han desarrollado distintos mecanismos de defensa para resistir a los medicamentos de esta familia, entre ellos, la producción de β -lactamasas que han sido reportadas desde la década de los 80, es uno de los mecanismos más efectivos de los bacilos gramnegativos para

esquivar a los Betalactámicos, estos se han encontrado ampliamente en Enterobacterias causando en estas resistencia o sensibilidad disminuida a las penicilinas y otros antibióticos de esta familia (Quiñones 2017).

Cuando se le preguntó a los individuos si conocían la función de los antibióticos todas respondieron que sí; no obstante, de las cinco personas encuestadas, cuatro indicaron que los antibióticos funcionan para eliminar el dolor del animal y para atender golpes y caídas en ellos, solo una persona indicó que el uso de los antibióticos es exclusivo para la atención de infecciones bacterianas y que la única forma de que un antibiótico colabore con la disminución del dolor en el animal se debería a que el dolor fuera producido por una infección bacteriana y esta disminuyera conforme se aplicaba el tratamiento, indicó entonces que los medicamentos adecuados para la atención del dolor eran los analgésicos.

En relación con el concepto de “Resistencia a los antimicrobianos” tres de cinco encuestados indicaron haberlo escuchado, pero, dos personas entendían el concepto más claramente cuando hacía alusión al uso de desparasitantes más que al de antibióticos.

Con respecto al asesoramiento veterinario, de las fincas encuestadas dos indicaron recibir la visita de un médico veterinario cada cuatro meses, una indicó cada seis meses o un año, el responsable de otra mencionó que cada dos años y en otra se dijo no recibir visitas por iniciativa propia. Así mismo, todos exteriorizaron que la consulta veterinaria la valoran necesaria solo en “casos especiales”, ya que para los

problemas de salud más comunes consideran conocer un correcto manejo empírico o pueden consultarlo con otros productores que hayan tenido casos similares.

Estos datos dejan al manifiesto un insuficiente asesoramiento médico en las fincas consultadas y una percepción errónea por parte de las personas productoras sobre la importancia del asesoramiento médico veterinario. Esta información aporta a lo sugerido por Rojas (2019), quien infirió a partir de los resultados de 17 encuestas realizadas a fincas en las zonas cercanas al Parque Nacional Tortuguero y al Parque Nacional los Quetzales que existe una faltante de capacitación y sensibilización a las personas productoras por parte de profesionales veterinarios, lo que repercute en un mal manejo de los medicamentos y abordaje médico en general.

La Guía de Buenas Prácticas Agropecuarias del Ministerio de Agricultura y Ganadería es un documento con el propósito de indicar pautas generales por aplicarse en los procesos de producción agropecuaria para minimizar riesgos en la degradación del ambiente, contaminación física, química y biológica de los productos (MAG 2008). En su apartado “Buenas prácticas para el uso y manejo de productos veterinarios y alimentos para animales”, únicamente se incluye una referencia relacionada con la aplicación de medicamentos, indicando lo siguiente: “En la administración de productos veterinarios, es importante prever la posibilidad de que se produzcan efectos adversos en los animales o en las personas que los administran; por lo tanto, en lo posible deben ser aplicados bajo supervisión directa de un Médico Veterinario” (MAG 2008).

Es importante distinguir que el texto anterior solamente sugiere el acompañamiento por médicos veterinarios cuando se deban aplicar medicamentos en los animales. Sin embargo, como se explicó previamente, los productores tienen sus propias razones para no considerar necesaria o posible la supervisión y guía directa por parte de dichos profesionales.

Aunado al problema anterior, cuatro de las personas encuestadas indicaron no tener conocimiento sobre el contenido de esta guía. Estas observaciones son similares a las halladas en estudios previos para estas mismas zonas, en las que, de una muestra de 17 encuestas, un 71% no conocía la existencia de esta guía (Rojas 2019). Por tanto, no es de extrañar que muchas de las disposiciones contenidas en esta guía no estén siendo aplicadas en las fincas o solo lo sean de forma parcial. Los datos que obtienen dichas encuestas señalan que los encuestados adquieren sus medicamentos en los establecimientos veterinarios o agro veterinarios más cercanos a su lugar de trabajo. Existe una responsabilidad compartida de parte de las dependencias del gobierno, el sector privado y el gremio de médicos veterinarios por respetar (y hacer respetar) las disposiciones legales que limitan la compra de antibióticos bajo receta médica o para ser medicamentos manejados únicamente por profesionales de la salud animal. Esto mismo aplica para la concientización sobre el manejo responsable de estos fármacos en los distintos procesos de producción, en aras a contribuir con una salud que beneficie por igual a todas las partes involucradas.

Finalmente, como se observa en el Cuadro 4, cuatro de las fincas encuestadas reportaron haber sufrido casos de depredación por parte de animales silvestres en el último año.

Debido a la importancia que tienen estos eventos y a la alta incidencia que hubo, se detallan por separado (Cuadro 5).

Cuadro 6. *Casos de depredación y medidas de prevención implementadas según la encuesta realizada durante la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica.*

| <u>Finca</u> | <u>Casos de depredación último año</u> | <u>Especie depredada</u> | <u>Especie Depredadora</u> | <u>Medidas Implementadas</u> |
|------------------|--|-----------------------------------|----------------------------|---|
| Finca de truchas | 10 | Truchas | Mapache, nutria, garza. | Toldo de sarán sobre estanques afectados, Cerca eléctrica |
| Las Vueltas | 4 | Cabras Gallinas Patos | Puma Mapache Mapache | Trampas, cámaras de seguridad, cercas eléctricas |
| Ceci | 1 | Perro Ternera menor de 5 meses | Coyotes Jaguar | Espantapájaros, Luces con activación por movimiento |
| Familiar | 3 | Novillo Perro Gallinas | Jaguar Jaguar Jaguar | Luces con activación por movimiento |

Dichos eventos son importantes de atender no solo por el riesgo biológico que implica un mal manejo de la interfaz humano-naturaleza, sino también por el conflicto social que se genera entre los humanos y los animales silvestres, el cual tiene consecuencias negativas para la conservación y para la dinámica socioeconómica de la comunidad (Panthera 2015).

Por otra parte, estos casos de depredación de animales silvestres sobre los de producción o mascotas implican un riesgo de transmisión de genes de resistencia a antibióticos entre especies. Los animales silvestres podrían depredar los de producción o mascotas que, ya sea por caso de enfermedad u otro tipo de razones, estén o hayan estado bajo tratamientos médicos, los cuales pueden incluir medicamentos antibióticos sin la supervisión de un médico veterinario. También es riesgoso por el hecho de que los silvestres se acerquen a zonas cercanas a los establecimientos de producción, los cuales en algunos sitios son espacios compartidos entre distintas especies domésticas, de forma que entren en contacto con ambientes contaminados (Rojas 2019; Ramey y Ahlstrom 2020).

Los casos de depredación fueron un apartado muy interesante de la encuesta ya que, a diferencia de otros riesgos identificados, las fincas productoras han venido implementando distintas estrategias para prevenirlos.

Las fincas han implementado diferentes estrategias anti-depredatorias según el tipo de animal implicado que han logrado identificar. En el caso de las fincas Ceci y Familiar (zona Tortuguero), su estrategia de colocación de luces con activación de movimiento fue implementada a partir de sugerencias y guía de parte de la organización Panthera, actividades que forman parte de la Unidad de Atención de Conflictos con Felinos (UACFel) de esta organización (Panthera 2015). Ambos exteriorizaron que ha sido efectiva para prevenir los ataques de felinos contra su ganado.

Para el caso de la Finca de truchas y Las Vueltas, el desarrollo de las maniobras anti-depredatorias ha sido un proceso más individual que ha incluido más prácticas de prueba y error para determinar qué resulta más efectivo. Estos últimos consideran que las cercas eléctricas constituyen una medida muy efectiva para detener los casos de depredación. En la Finca de truchas también han implementado mallas de sarán sobre los estanques para prevenir la visualización de las truchas para las garzas y dificultar su estrategia de caza sobre ellas.

Es importante seguir investigando sobre la efectividad de las estrategias tomadas por las personas productoras para prevenir los casos de depredación sobre sus animales, ya que estas son valiosos aportes para el fortalecimiento de las actividades agro-productivas responsables con la sociedad y el medio ambiente.

3.2. Segundo objetivo

Se realizó un grupo de tres infografías de carácter introductorio al trabajo interdisciplinario en investigaciones de campo con el enfoque una salud dirigida a estudiantes de medicina veterinaria. En el pasado se han realizado investigaciones que coinciden en que las infografías son herramientas de comunicación que impactan en el acceso y apropiación del conocimiento de sus distintos públicos meta, además de que han sido recursos fortalecidos con su uso a través de las redes sociales virtuales (Minervini 2005; Alberich y Castillo 2017).

La primera infografía explica los conceptos básicos de una salud, resistencia a antibióticos y uso indiscriminado de antibióticos (Figura 4).



Figura 4. Infografía 1: Introducción de conceptos: una salud, resistencia a antibióticos y uso indiscriminado de antibióticos. Realizado durante la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica.

Esta primera infografía pretende contextualizar brevemente a su público meta en un problema de índole global que les compete directamente: como estudiantes de una carrera que les encomendara la educación de los usuarios, la prescripción y la aplicación de estos medicamentos, así como personas que se pueden ver afectadas por las consecuencias en la salud pública de la resistencia antimicrobiana (Minervini 2005).

La intención de esta imagen es que al ser impresa o distribuida por las redes sociales esta pueda ser leída por estudiantes de primer ingreso de la carrera, así como por estudiantes avanzados y también por profesionales (Alberich y Castillo 2017). Para este proyecto de investigación es importante aumentar la difusión del problema tratado, en las distintas generaciones de estudiantes de medicina veterinaria, resulta de suma importancia que se familiaricen con estos conceptos desde el inicio de la carrera para que conforme avancen en su formación profesional le presten particular atención a la búsqueda de soluciones, eviten repetir malas prácticas y para fomentar su interés en investigaciones relacionadas con el tema, de forma que propongan nuevos proyectos de investigación y también deseen cada vez más participar en proyectos de investigación como este que busquen mitigar un problema de salud pública y contribuir a la buena salud ambiental (Beldoménico et al. 2003).

Como se explica en el documento “Preventing the Next Pandemic” de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) (2020), el enfoque una salud es el recomendado para enfrentar las enfermedades emergentes, y este precisa de una amplia articulación de distintos sectores de la sociedad. De esta forma se está claro que la medicina veterinaria es un pilar elemental para entender y tratar el problema de

la resistencia a los antibióticos; sin embargo, además de entenderlo, es necesario transferir el conocimiento a otras esferas sociales y académicas (Mazzaro 2010), una forma es trabajando interdisciplinariamente con profesiones de otras áreas para poder crear un plan de mitigación y resolución del problema a corto, mediano y largo plazo.

Uno de los principales retos de la ciencia es aumentar la divulgación de sus hallazgos, los últimos años se ha hecho más y más consciencia sobre la importancia de comunicar de forma clara y agradable las observaciones y descubrimientos científicos en los distintos niveles, tanto para la sociedad general pero también para los estudiantes y colegas (Belenguer 2003).

La segunda infografía comparte algunos hallazgos derivados de las encuestas aplicadas durante las giras en la pasantía que son parte del proyecto de investigación “Evaluación del grado de contaminación con antibióticos en felinos silvestres y sus hábitats en los parques nacionales Braulio Carrillo, Tortuguero y Los Quetzales” que alertan sobre factores de riesgo para la contaminación ambiental con antibióticos (Figura 5).



Figura 5. Infografía 2: Hallazgos sobre factores de incidencia en la contaminación ambiental con antibióticos obtenidas de las encuestas aplicadas en las giras de campo y a través de llamada telefónica durante la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica.

Con esta ficha de estudio se busca lograr esta divulgación a través de imágenes, de forma amena y resumida, de los hallazgos obtenidos durante esta pasantía sobre los factores de riesgo para la contaminación ambiental con antibióticos con otros estudiantes y profesionales de la carrera, para que al enterarse sobre ellos puedan valorar si estos hallazgos han sido parte de sus vivencias personales y profesionales, también para que sirvan de eco sobre la importancia de corregir estas prácticas indebidas y finalmente para que sirva de motivación en caso de que deseen realizar investigaciones o proyectos que amplíen, esclarezcan o contribuyan a las soluciones del problema (Belenguer 2003).

Esta información puede ser compartida por redes sociales y así tiene el potencial de agregar en su publicación, información para la búsqueda de este trabajo de graduación en la Biblioteca de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA y también contacto del proyecto para todas las personas interesadas (Alberich y Castillo 2017).

La tercera imagen explica tareas puntuales en las cuales han trabajado médicos veterinarios y estudiantes de la carrera para acercarse a la problemática estudiada e invita a trabajar en equipo en pro de compartir los descubrimientos y producir soluciones integrales al reto de utilizar los medicamentos antibióticos de forma responsable y racional (Figura 6).



Figura 6. Infografía 3: Aportes de la Medicina Veterinaria en equipos de trabajo interdisciplinarios para un proyecto de investigación con el enfoque una salud durante la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica.

Es importante dar a conocer algunos de los muchos aportes de la carrera de Medicina Veterinaria en espacios de trabajo que de alguna manera no son tan populares, ya que le conviene a los equipos de trabajo interdisciplinario que necesitan de los aportes de médicos veterinarios y también a un gremio que precisa que las personas estudiantes y los profesionales se motiven a ser parte de estos espacios no tradicionales que cada vez tendrán más importancia si se atienden los problemas globales de forma integral (Mazzaro 2010).

Por ejemplo, tomando en consideración modelos interdisciplinarios de trabajo, según los datos obtenidos durante la pasantía en el proyecto de investigación en el cual se participó, para atender el problema de la contaminación ambiental con antibióticos que contribuye a la expansión de la resistencia a estos fármacos, la ONU (2020) recomienda un plan de trabajo articulado que incluya:

- Un enfoque sociológico que ayude a comprender las motivaciones y la percepción de necesidad de las personas productoras que los lleva a aplicar medicamentos de forma empírica en sus animales y no considerar necesario o accesible buscar ayuda profesional.
- Ejercer consulta y presión sobre las dependencias gubernamentales acerca de su compromiso con las labores de monitoreo, regulación y acompañamiento que se da al sector agropecuario del país en zonas rurales.
- Aumento de los análisis costo-beneficio del uso irracional de antibióticos en la producción animal versus el uso racional de estos medicamentos.
- Apoyo a investigaciones científicas ampliadas que incluyan dimensiones sociales, económicas y ecológicas del desarrollo de enfermedades emergentes.

- Un cuerpo de profesionales médicos veterinarios bien capacitados y actualizados sobre el uso racional de antibióticos.
- Refuerzo de las organizaciones no gubernamentales por reducir los conflictos en la interfase humanos-vida silvestre.
- Trabajo en conjunto con profesionales de la comunicación colectiva y sector educativo para crear contenido que pueda ayudar a alertar a la población general a prestar atención a la emergencia mundial sobre la resistencia a antimicrobianos, y fomentar una educación que logre plasmar el contenido en los estudiantes de generaciones venideras para que puedan formarse con otro nivel de consciencia sobre el uso racional de antibióticos y sobre cómo su uso irracional afecta la salud de toda la esfera global (Gérvás 2000; Mazzaro 2010).

Por esta razón acorde a los modelos de una salud, es importante fortalecer en los estudiantes y los profesionales de la carrera de medicina veterinaria las capacidades para trabajar en equipo y al mismo tiempo reinventar la idea que se tiene sobre cuáles serán estos equipos ya que en muchas ocasiones y cada vez más, con el paso del tiempo pueden estar conformados por profesionales y estudiantes de otras carreras de ciencias exactas y sociales, profesionales de las artes y la comunicación, lideresas y líderes comunales, personas voluntarias, entre otras (Cardona y Wilkinson 2006).

3.3. Tercer objetivo

Durante la presente pasantía se tuvo la oportunidad de participar en la realización de un bioensayo con alevines de peces *P. dovii* del cual derivaron estudios moleculares, bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento, todos los anteriores se

llevaron a cabo en el laboratorio ECOTOX del IRET por parte de un equipo interdisciplinario.

La secuencia en la que se presenta la discusión de los resultados indica el orden de organización biológica de los organismos estudiados, de esta manera se desarrollan primero los resultados moleculares, seguidos por los bioquímicos, tercero la tasa metabólica basal y finalmente los resultados de comportamiento.

A partir de estos resultados se publicó el artículo científico titulado "Transient exposure to sublethal concentrations of a pesticide mixture (chlorpyrifos–difenoconazole) caused different responses in fish species from different trophic levels of the same community" en la revista científica "Comparative biochemistry and Physiology" (Anexo 2) (Redondo et al. 2021).

3.3.1. Análisis Molecular

Posterior a un periodo de exposición de 48 h de una mezcla binaria de DFZ con CPF se detectó que sí hubo cambios moleculares en las muestras de hígado de los peces al analizarlas por RT-PCR de forma que los organismos expuestos a la mezcla presentaron una mayor expresión del *Cyp1A* (Figura 7).

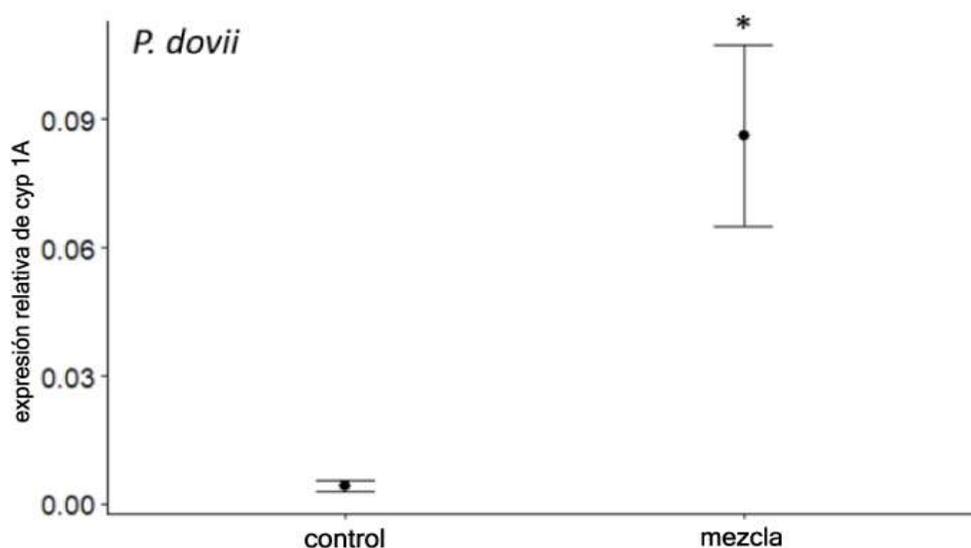


Figura 7. Expresión relativa de *cyp1A* en hígado de *P. dovii* tras exposición a mezcla de plaguicidas. Número de copias de ARNm de *cyp1A* por cada mil copias del gen de referencia (beta-actina). *El asterisco (*) indica diferencia significativa entre tratamientos.*

Anteriormente, en la investigación de Zhang y colaboradores (2017) se demostró la presencia de cambios moleculares y bioquímicos en hígados de peces expuestos a difenoconazol por un periodo más amplio de 180 días. En esa investigación se observó un aumento en la expresión de los genes *cyp1A1*, *cyp1B* y *cyp1C1* acompañado de un aumento en las enzimas EROD y GST en hígado.

Los resultados de este bioensayo son específicos de la especie estudiada debido a que, incluso utilizando la misma concentración, combinación de plaguicidas y tiempo de exposición, las consecuencias en cuanto a sus alteraciones moleculares, metabolismo y comportamiento de los peces no necesariamente serían las mismas entre especies distintas. En ese sentido, el equipo de trabajo replicó (posterior al

término de esta pasantía) un bioensayo con las mismas características en peces *P. gillii* y en esta especie la inducción del gen *cyp1A* sí estuvo acompañada de un aumento en la actividad de EROD, aspecto que no sucedió en *P. dovii* (Redondo et al. 2021).

Las especies pueden tener diferentes actividades basales de enzimas codificadas a partir de genes pertenecientes a la familia del citocromo P450 y, por ende, distintas respuestas bioquímicas a la exposición con xenobióticos. La clave de esto se cree que puede ser su alimentación, ya que distintos compuestos naturales de la dieta pueden ocasionar que se sostengan niveles mayores de proteínas relacionadas a *cyp* (inductoras del proceso de biotransformación) (Schlenk et al. 2008).

Existe referencia sobre niveles más altos de proteínas tipo *cyp2B* en peces mariposa (*Chaetodon capistratus*) que consumen “gorgonios” (con un alto nivel de aleloquímicos) que en individuos que no los ingieren (Vrolijk et al. 1994), la misma tendencia se ha reportado en especies de peces bermuda que son herbívoros en contraposición con especies de peces bermuda que son carnívoros (Stegeman et al. 1997). Por ello, es necesario continuar investigando si los químicos contenidos en la dieta natural de distintas especies actúan como inductores de formas *cyp2B*-like o si existen otros mecanismos involucrados (Schlenk et al. 2008).

En investigaciones anteriores en muestras de hígados de peces *Oncorhynchus mykiss* expuestos a benzopirinas se había observado una inducción temprana de la transcripción de *cyp1A* acompañada con un aumento en la actividad de EROD entre

seis h y 24 h luego de la exposición, la cual se sostuvo al menos hasta las 72 h después de la exposición (Levine y Oris 1999).

Este resultado del bioensayo establece bases importantes para continuar investigando sobre estos cambios moleculares como alertas tempranas ante episodios de exposición aguda a contaminantes ambientales en el agua, ya que en este escenario de exposición temprana no se aumentó la actividad enzimática, pero sí la transcripción del citocromo *cyp450* que les codifica. Conocer la sensibilidad de los diferentes biomarcadores en las especies resulta importante para entender en qué momento sería más útil o viable la medición de cada uno para detectar eventos de contaminación agudos en medios acuáticos, incluso antes de que los mismos hayan generado cambios evidentes en el comportamiento y la salud de las poblaciones de peces. De esta forma se pueden identificar a tiempo estos eventos y corregirlos para prevenir mayores consecuencias en la salud poblacional de la fauna acuática.

Las enzimas del citocromo P450 (*cyp*) tienen participación importante en la activación e inactivación de diferentes sustancias precancerígenas. En un ambiente natural, la misma estimulación del sistema citocromo P450 que aumenta los procesos de biotransformación en presencia de compuestos contaminantes, también podría bioactivar otras sustancias con potencial precancerígeno que se encuentren presentes en el ambiente. Estas interacciones y sus consecuencias continúan hoy día en estudio con la finalidad de entender estas dinámicas. Los genes del citocromo P450 más estudiados por su posible participación en la bioactivación de precancerígenos hasta el momento han sido el *cyp1A1* y el *cyp1A2* (Rodríguez e Ingelman 2006).

3.3.2. Análisis Bioquímico

Seguidamente en el bioensayo se midieron dos marcadores bioquímicos:

- La actividad EROD, producto de la codificación del gen *cyp1A* en la fase I de biotransformación: activado como una respuesta del organismo tras haber sido expuesto a compuestos triazoles, familia química del DFZ.
- La actividad ChE: vinculada con neurotoxicidad en peces debido a que el tejido nervioso es el blanco biológico del CPF.

Los resultados de las mediciones determinaron que los peces expuestos a la mezcla plaguicida no produjeron una inducción significativa de EROD en el hígado y tampoco una inhibición significativa de ChE en cerebro o músculo (Figura 8).

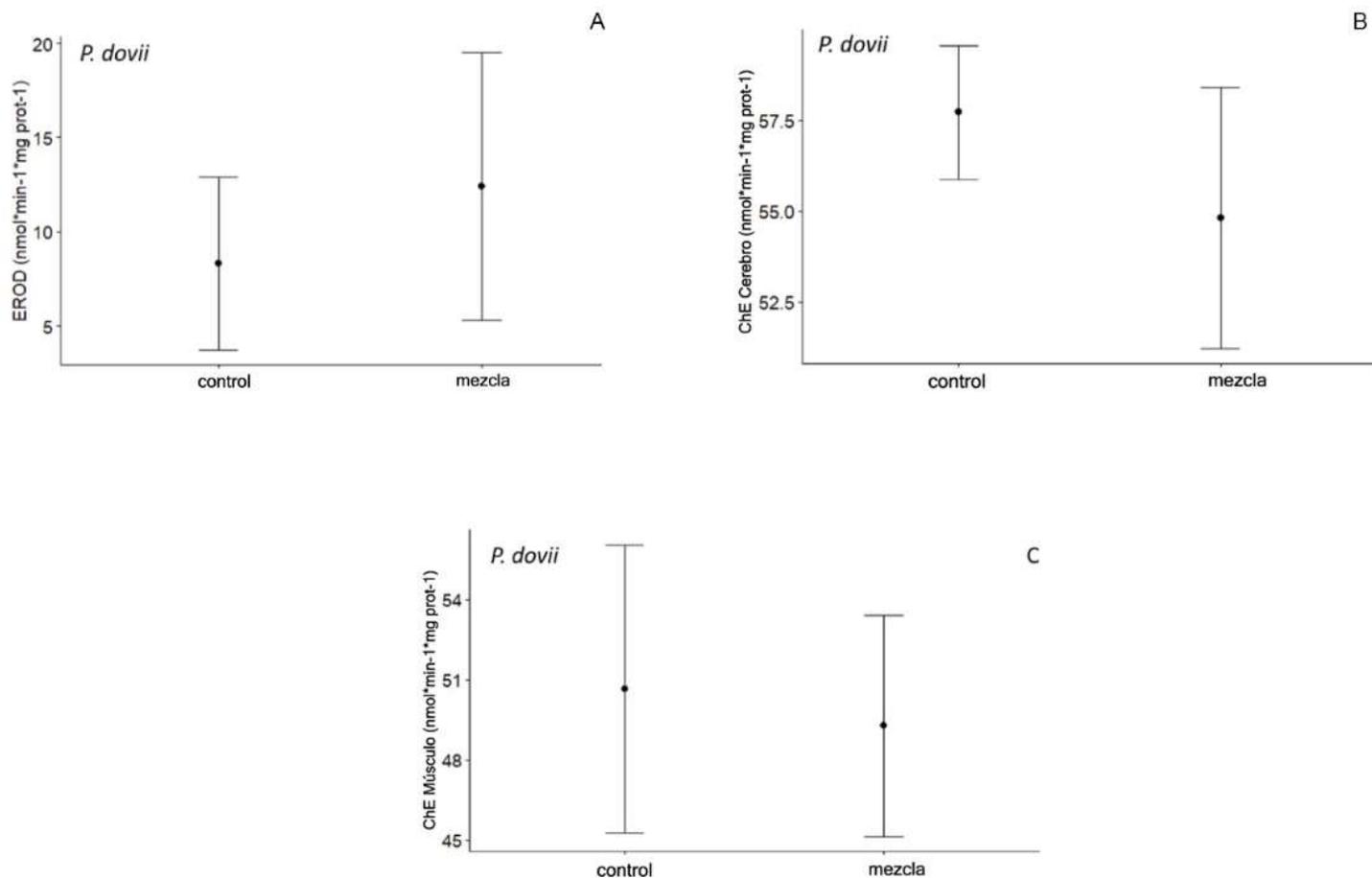


Figura 8. Biomarcadores enzimáticos. Actividad EROD en hígado (A), actividad ChE en cerebro (B) y músculo (C), en alevines de *P. dovii* expuestos a CPF (5.5 µg/L) + DFZ (325 µg/L). Experimento realizado en la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica.

Valorando todas las posibles razones para que los marcadores bioquímicos no se afectarán significativamente pueden considerarse: la degradación de los compuestos en el agua (Narvaez et al. 2012; IRET-UNA 2021), las concentraciones y el tipo de plaguicida al que fueron expuestos los peces, el corto periodo de exposición que se utilizó (48 h) (Jiménez 2019), las interacciones existentes entre los CPF con el

DFZ (Wang 2009) y las características fisiológicas propias de la especie de peces utilizada, así como otros aspectos de su biología (Schlenk et al. 2008).

Al iniciar el bioensayo tanto DFZ como CPF estuvieron presentes, pero sus concentraciones disminuyeron para el final de este. El CPF resultó indetectable al final del bioensayo y DFZ se redujo en poco más de la mitad de su concentración inicial (Cuadro 6).

Cuadro 7. *Concentraciones nominales y cuantificadas de DFZ y CPF en muestras recolectadas al inicio y final de las pruebas durante la pasantía en el IRET-UNA, Heredia. Costa Rica.*

| <u>Concentración</u> <u>Nominal del</u> <u>Experimento</u> | <u>Concentración al inicio</u> <u>del bioensayo ($\mu\text{g/L}$)</u> | <u>Concentración al final del</u> <u>bioensayo ($\mu\text{g/L}$)</u> |
|--|---|--|
| Difenoconazol 325 $\mu\text{g/L}$ | 298 (289-321) | 123 (75-126) |
| Clorpyrifos 5.5 $\mu\text{g/L}$ | 2 (1-4) | no detectado |

Una explicación de estas disminuciones pueden ser los diversos procesos ambientales de fotodegradación, degradación e hidrólisis química que causan que las concentraciones de los compuestos originales de la mezcla utilizada se reduzcan paulatinamente, lo que puede disminuir así su toxicidad para los peces expuestos

(Giezy et al. 1999). Sin embargo, estos procesos de degradación parcial también pueden ocasionar que se produzcan algunos metabolitos (subproductos) con mayores capacidades de bioacumulación y toxicidad que los compuestos parentales (Narvaez et al. 2012). Cuando estos metabolitos tienen mayor bioacumulación en los organismos, resultan muy perjudiciales en la fase ambiental del tóxico debido a la dinámica de la cadena trófica que favorece al fenómeno de biomagnificación (Wang et al. 2019).

En el caso de CPF, este tiene baja persistencia ambiental y sufre procesos de degradación eficientes debido a sus enlaces fosfodiéster (Giezy et al. 1999) por esta razón pudo haberse degradado más rápidamente en comparación con el DFZ, cuya degradación es más lenta en el agua y en el suelo y este produce metabolitos muy resistentes a fotólisis y persistentes a los procesos de hidrólisis en el agua y en la interfaz agua-sedimento. Por esta razón posterior a la exposición de 48 h siguió siendo detectable en el agua (IRET-UNA 2021).

Ambas sustancias tienen elevados coeficientes de partición octanol-agua (CPF: $358 \log K_{ow} = 4.7$; DFZ: $\log K_{ow} = 4.4$) y vidas medias más prolongadas en la interfaz sedimento-agua (CPF: cinco días en agua vs. 36 días en sedimento-agua; por su parte DFZ: tres días en agua vs. 1053 días en sedimento-agua) (Lewis et al. 2016). Esto sugiere que el sedimento sea un vehículo de exposición importante en organismos acuáticos, especialmente para organismos de los niveles tróficos más bajos. Este bioensayo no incluyó esta variable; sin embargo, es importante considerar para el futuro en aras a tener panoramas más cercanos a la realidad en que se incluyan las

rutas de exposición más relevantes según el organismo y los contaminantes por evaluar (Sibley et al. 2000).

Como se dijo anteriormente, las respuestas de estos biomarcadores pueden alterarse por el periodo de exposición (Giezy et al. 1999). Por ejemplo, en una exposición idéntica a la realizada en la misma especie, pero extendida hasta 96 h sí llega a aumentar la actividad enzimática hepática de EROD (Jiménez 2019). Esto se puede deber a la secuencia en la que van ocurriendo los procesos toxicocinéticos ya que los organismos pueden realizar una detoxificación basal sin que se causen alteraciones significativas, en respuesta a una concentración subletal sostenida por un periodo corto de exposición (Oruç 2010; Botté et al. 2012).

Los resultados obtenidos en este bioensayo son valiosos porque complementan la información sobre los posibles efectos agudos de plaguicidas en diferentes niveles de organización. Se sabe que mezclas de plaguicidas activan en el proceso metabólico de biotransformación a la superfamilia enzimática del citocromo P450 (*cyp*), la cual incluye un grupo amplio de enzimas involucradas en la catálisis de oxidación, bioactivación y detoxificación de sustancias, lo cual facilita la excreción de productos formados en el cuerpo. El proceso se lleva a cabo por inducción de la enzima 7-etoxi-resorufina-O-deetilasa (EROD). Por esta razón la enzima se considera un biomarcador sensible no específico para identificación de exposición a xenobióticos. Sin embargo, estos cambios en la activación enzimática de EROD son precedidos por cambios moleculares referentes al nivel de expresión génica de EROD en peces expuestos a DFZ (Zhang et al. 2017). Esto podría explicar porque en este bioensayo pudo

observarse cambios moleculares antes de encontrar cambios bioquímicos en este corto periodo de exposición.

El hecho de que la mezcla de CLP con DFZ no indujo una inhibición de ChE a pesar de que el primer compuesto es neurotóxico (Figura 8. B y C), puede deberse a una posible relación antagonista del DFZ sobre el mecanismo de neurotoxicidad de CLP en esta especie. Es posible que, si la mezcla aumenta la inducción enzimática EROD en el hígado, se aumente el metabolismo de la sustancia de forma que se previenen sus efectos tóxicos sobre la actividad ChE en tejidos del cerebro y músculo (Wan et al. 2009), los cuales pueden manifestarse como cambios negativos en la ubicación espacial y el comportamiento optomotor del pez que llegan a dificultar la capacidad de alimentación, identificación y evitación de depredadores (Dutta y Arends 2003).

Sin embargo, no en todos los casos de contaminación ambiental con plaguicidas se van a dar interacciones que resulten antagónicas, pues es más común que la combinación de dos o más plaguicidas tengan efectos sinérgicos o aditivos que incrementen su toxicidad en los individuos (Wang et al. 2017).

Con base en los resultados obtenidos en el presente ensayo se puede considerar que la exposición transitoria a la mezcla de pesticidas utilizada fue suficiente para inducir la transcripción del gen, pero no para aumentar significativamente la actividad catalítica.

3.3.3. Tasa Metabólica Basal

No hubo diferencia en la tasa metabólica basal de los peces expuestos con respecto a los controles. Esto sugiere que no hubo consecuencias fisiológicas negativas en los peces para adaptarse al ambiente a este nivel de exposición a contaminantes (Figura 9).

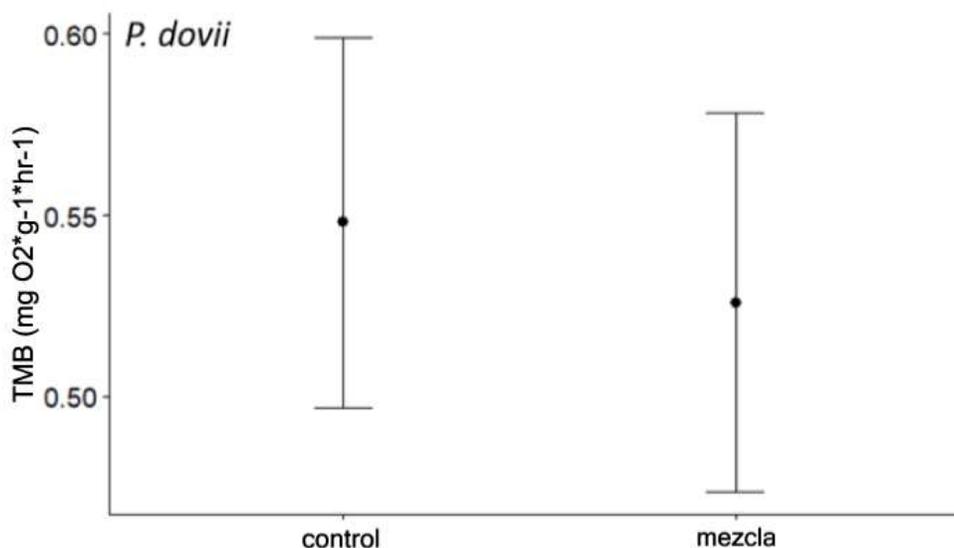


Figura 9. Tasa metabólica en alevines *P. dovii* tras exposición a una mezcla de DFZ con CLP durante 48 h, durante un experimento en la pasantía en el IRET-UNA, Heredia, Costa Rica.

Se entiende que la tasa metabólica basal y el consumo de oxígeno brindarían información sobre los efectos de los contaminantes en los individuos expuestos (Sandoval-Herrera et al. 2019) ya que aumentan por condiciones de estrés, así como durante procesos de detoxificación o reparación, porque los individuos precisan de una mayor movilización energética en su organismo con la intención de sobrevivir a las perturbaciones ambientales, lo que ocasiona un aumento en el consumo de oxígeno y

en la tasa ventilatoria debido a la disminución en la capacidad del pez por sobrellevar ese estrés ambiental (Yang et al. 2000; Prassana et al. 2020).

3.3.4. Comportamiento

No se encontraron diferencias significativas en la preferencia de una interfaz en específico entre los organismos expuestos y el grupo control (Figura 10).

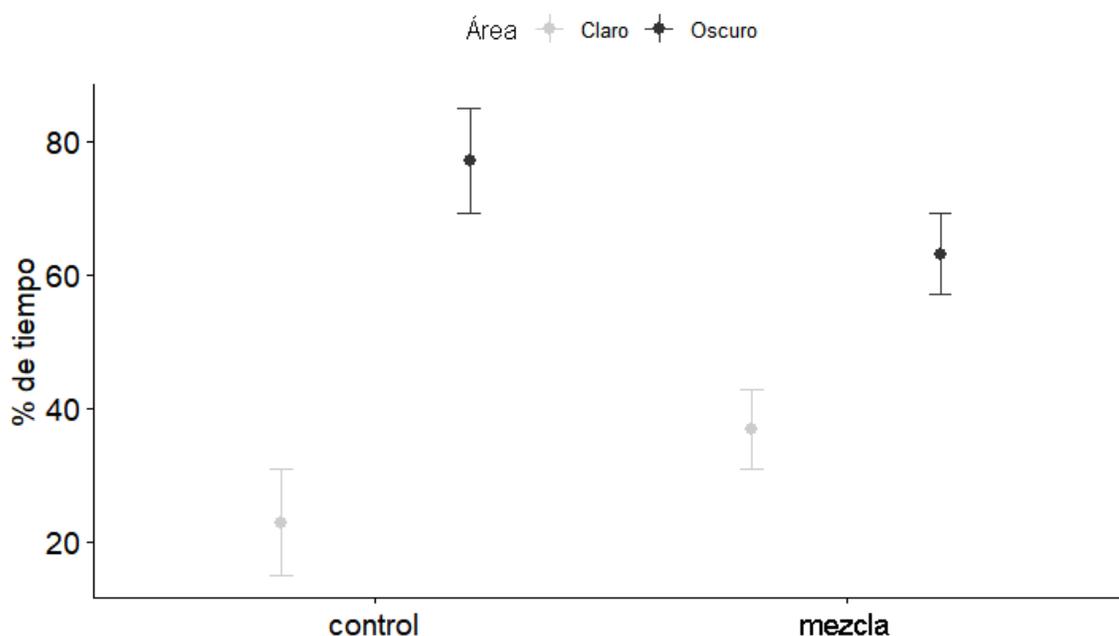


Figura 10. Porcentaje de tiempo que cada grupo (control y mezcla) de peces *P. dovii* pasó en el área clara u oscura del acuario durante la prueba de escototaxis en la pasantía en el IRET-UNA. Heredia, Costa Rica.

Como parte del estudio de Redondo y colaboradores (2021), esta prueba se replicó en las mismas condiciones para peces *P. gillii*. En estos, el grupo control estuvo más tiempo en la zona clara en comparación con el grupo control de *P. dovii*, pero también se observó que el grupo de *P. gillii* expuesto a la mezcla de pesticidas tuvo un

aumento en la cantidad de tiempo que pasó en la zona clara del estanque. Esto significa que en esta especie la exposición a la mezcla de pesticidas sí ocasionó un efecto desinhibitorio en los organismos (Sloman y McNeil 2012).

En relación con el comportamiento de los grupos control de ambas especies es importante tomar en cuenta que los peces *P. dovii* son una especie que se puede encontrar en aguas oscuras, escondidos detrás de rocas o en el suelo de forma que se minimice su visibilidad en el entorno (Tabash y Guadamuz 2000). En cambio, los peces *P. gillii* por su naturaleza se alimentan de detritos y algas (Furness et al. 2020), buscando comida en zonas más claras en horas de luz del día.

Los resultados obtenidos para *P. dovii* indican que tras la exposición a la mezcla durante 48 h no hubo cambios en el comportamiento de los individuos que pudieran interferir en sus capacidades para buscar alimento, camuflarse, prevenir el ataque de depredadores y huir de ellos, así como otras necesidades de desplazamiento (Robinson 2009; Sloman y McNeil 2012).

Estos hallazgos son congruentes con los resultados de la tasa metabólica basal, en los cuales tampoco hubo cambios significativos, ya que se entiende que muchos casos los cambios en el comportamiento de los peces suelen resultar como consecuencia del estrés fisiológico por el que pasan en respuesta a perturbaciones ambientales (Robinson 2009). Aunque dependiendo de la sustancia se pueden observar algunos efectos neurotóxicos a nivel bioquímico y de comportamiento sin que necesariamente haya un compromiso de la tasa metabólica basal de los peces (Sandoval-Herrera et al. 2019).

Conocer la dinámica de los biomarcadores en distintos niveles de organización en individuos acuáticos permite entender mejor el aprovechamiento de cada uno de ellos en relación con la exposición ambiental de los contaminantes (Koehle-Divo et al. 2019) ya que en los contextos actuales es común encontrar mezclas de contaminantes que interactúan entre sí de forma diversa, por lo tanto, estudiar los cambios a partir de las mezclas brinda un panorama más acertado sobre lo que sucede en el ambiente (Celandier 2011; Kunce et al. 2017). En estos contextos complejos es necesario estar al tanto sobre los cambios moleculares y bioquímicos aunados a las respuestas fisiológicas y de comportamiento para aumentar la relevancia ecológica de evaluar biomarcadores en peces (Kunce et al. 2017; Lebrun et al. 2020).

4. CONCLUSIONES

4.1. Esta pasantía constituyó una excelente oportunidad para registrar datos sobre el manejo de antibióticos en actividades pecuarias e identificar posibles fuentes de contaminación al medio ambiente. Durante el proceso se pudo notar que existe una falta de comunicación entre los profesionales de la salud animal y las personas productoras lo que promueve la proliferación de creencias y seguidamente, prácticas indebidas en el manejo dentro de las fincas que favorecen la resistencia a los antibióticos y contaminación del medio ambiente, como la medicación empírica de animales, manejo incorrecto de los botiquines de medicamentos, desecho incorrecto al ambiente de materiales médicos, entre otros.

4.2. En la pasantía fue posible apoyar al equipo de trabajo interdisciplinario del proyecto “Evaluación del grado de contaminación con antibióticos en felinos silvestres y sus hábitats en los parques nacionales Braulio Carrillo, Tortuguero y Los Quetzales” a través de la creación de material gráfico que sirve como una guía introductoria o una invitación para estudiantes y profesionales que deseen animarse a participar en equipos de investigación que impliquen dinámicas de trabajo interdisciplinario bajo el enfoque una salud, lo que fue de gran provecho para repasar conceptos y visibilizar la gran cantidad de aportes desde la medicina veterinaria que pueden producirse bajo dinámicas de trabajo con agendas interdisciplinarias.

4.3. Durante la pasantía se adquirieron destrezas necesarias en el trabajo de laboratorio al aplicar métodos de identificación de biomarcadores bioquímicos, transcriptómicos, fisiológicos y de comportamiento en peces, con el fin de evaluar el

impacto de contaminantes químicos. A partir de un bioensayo se identificó que el biomarcador más temprano para peces *P. dovii* expuestos a una mezcla de plaguicidas de CPF con DFZ corresponde a las pruebas moleculares por medio de RT-PCR que identifican genes de la familia *cyp1A*, los cuales aumentan antes de que se puedan observar alteraciones bioquímicas, fisiológicas y de comportamiento en los peces estudiados. Esto es muy importante para guiar en el correcto uso de los biomarcadores y apoyar en la temprana identificación de eventos de contaminación en ríos antes de que sucedan catástrofes ambientales evidentes.

5. RECOMENDACIONES

5.1. Al Colegio de Médicos Veterinarios y al Ministerio de Agricultura y Ganadería se recomienda establecer campañas o reforzarlas (con su respectivo acompañamiento sociológico) de sensibilización hacia a las personas productoras sobre la importancia del acompañamiento médico veterinario, de forma que puedan tomar mejores decisiones en los sistemas de producción animal. Asimismo, realizar campañas de información dirigidas a este público, donde se les explique el concepto de resistencia a antibióticos y su importancia. De esta manera, se podrá poner en práctica el concepto de Una Salud para que sus actividades velen por la salud ambiental, la salud ocupacional y la inocuidad de sus productos.

5.2. A la Escuela de Medicina Veterinaria se recomienda que se fortalezcan las habilidades psicológicas y formativas en los estudiantes a través de los cursos de carrera para que sean capaces de conformar hábilmente equipos de trabajo interdisciplinarios y para formar profesionales que contextualicen los problemas que nos competen en la disciplina dentro de las distintas realidades sociales, económicas y ambientales que conforman el país y de esta manera que puedan encontrar soluciones innovadoras y efectivas ante los problemas que se enfrentan. Para esto es recomendable incorporar proyectos que involucren trabajo y práctica con estudiantes y profesionales de otras áreas académicas, así como con personas de la sociedad civil.

5.3. A las personas investigadoras universitarias se recomienda tomarse el tiempo de diseñar el mejor planteamiento experimental que les sea posible con el fin de maximizar recursos, ya que en la actualidad, si bien es cierto existen muchas

herramientas de laboratorio que hacen posible medir diversos biomarcadores en animales útiles para identificar niveles de estrés ocasionado por eventos de contaminación, estas herramientas tendrán mayor alcance en la medida que los estudios realizados sean integrales y evalúen el contexto más cercano a la realidad como sea posible.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abascal E y Grande I. 2005. Análisis de encuestas. ESIC EDITORIAL. [Internet]. [citado el 10 de setiembre de 2021]. Disponible en: https://books.google.co.cr/books?hl=en&lr=&id=qFczOOiwRSgC&oi=fnd&pg=PA9&dq=como+hacer+encuestas&ots=eCYzJ8T4Qg&sig=N0Npxk9Cfx0manLuCbZvZzb8ZuY&redir_esc=y#v=onepage&q=como%20hacer%20encuestas&f=false
- Alberich J, Castillo I. 2017. Análisis de estrategias de difusión de contenidos y actividad en redes sociales en revistas de divulgación científica: factores de interacción, visibilidad e impacto. Estudios sobre el Mensaje Periodístico. [Internet]. [citado el 13 noviembre de 2020]; 23 (2): 1045-1056. Disponible en: <https://doi.org/10.5209/ESMP.58031>
- Amador-Muñoz G, Arce M, Gonzáles M, Alpízar B, Reyes E, Vargas, E, Acedo I, Ramírez F, Vásquez O, Jiménez M, Castro J, Robles A, Cordoze M, Días J, Arias L, Blanco K. Costa Rica Gobierno del Bicentenario. 2018. Plan de acción nacional de lucha contra la resistencia de los antimicrobianos Costa Rica 2018-2025. [Internet]. [citado el 06 de enero de 2021]. Disponible desde: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/normas-protocolos-y-guias/resistencia-microbiana>
- Ángulo A, Esperón F, Salom R, Carazo J, Taylor F, Pilé E, Blanco K. 2017. Identificación de genes de resistencia a antimicrobianos en felinos silvestres:

¿Muestra del impacto de las producciones pecuarias en los ecosistemas?
Ciencias Veterinarias. [Internet]. [citado el 28 de febrero de 2020]; 36 (3): 35.
Disponible en:
<https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/article/view/12168/16925>
[//doi.org/10.15359/rcv.36-3.24](https://doi.org/10.15359/rcv.36-3.24)

Araya M, Arias M, Chaves C, Davidovich, G. 2005. Identificación de *Enterococcus* sp. en muestras de leche cruda del Área Metropolitana de Costa Rica y evaluación del patrón de sensibilidad a antibióticos. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN). [Internet]. [citado 29 de febrero 2020]; 55 (2): 161-166. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222005000200009

Arenas N, Moreno V. 2018. Producción Pecuaria y Emergencia de Antibiótico Resistencia en Colombia: Revisión Sistemática. Infectio. [Internet]. [citado 29 de octubre 2021]. 22 (2): 110-119. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922018000200110

Auquilla R. 2005. Uso del suelo y calidad del agua en quebradas de fincas con sistemas silvopastoriles en la Subcuenca del Río Jabonal, Costa Rica. Turrialba. Turrialba, C.R.: Tesis (Magister Scientiae). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

- Baldi M, Barquero E, Hutter S, Walzer C. 2019. Salmonellosis detection and evidence of antibiotic resistance in an urban raccoon population in a highly populated area, Costa Rica. *Zoonoses Public Health*. 66: 852-860.
- Beldoménico M, Antoniazzi R, Paggi G, Acosta N, Kiener M, Sguerzo W, Perassi R, Camuz Ligios L, Costas L, Macedo A, et al. 2003. Roles de la Medicina Veterinaria en la Biología de la Conservación. Universidad Nacional del Litoral. [Internet]. [citado el 13 noviembre de 2020]; Disponible en: https://www.produccion-animal.com.ar/fauna/Fauna_Argentina_general/61-roles.pdf
- Belenguer, M. 2003. Información y divulgación científica: dos conceptos paralelos y complementarios en el periodismo científico. *Estudios sobre el Mensaje Periodístico*. (9): 43 - 53.
- Blanco K, Esperón F, Torres A, de la Torre A, de la Cruz E, Jiménez M. 2017. Antimicrobial Resistance Genes in Pigeons from Public Parks in Costa Rica. *Zoonoses Public Health*. 64 (7): 23-30.
- Bohórquez J. 2020. Persistencia de bacterias entéricas resistentes y genes de resistencia a antibióticos en sustratos suplementados con gallinaza comercial y de compostaje tradicional. Ecuador: Tesis para optar por el grado de Ingeniería Agrónoma. Universidad Técnica de Ambato.
- Botté E, Jerry D, Codi King S, Smith-Keune C, Negri A. 2012. Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. *Mar Pollut Bull* [Internet]. [citado el 26 febrero

de 2020]; 65(4–9): 384–393. Disponible en: doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.08.020.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* [Internet] [citado el 10 de setiembre de 2021]; 72: 248–254. Disponible en: http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf

Caamano H, Pascale P. 2014. Innovación ciudadana en Iberoamérica: Participación digital para la transformación social. Congreso Iberoamericano de Ciencia, Tecnología, Innovación y Educación. [Internet]. [citado el 13 noviembre de 2020]; ISBN: 978-84-7666-210-6 – Artículo 52. Disponible en: <https://raices-oei.org/Lineaciudadaniaydemocracia/InnovacionCiudadanaenIberoamerica.pdf>

Calderón G, Aguilar L. 2016. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev. méd. Costa Rica Centroam.* LXXIII. (621): 757 – 763.

Calow P. 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, [Internet]. [citado el 13 noviembre de 2020]; 420. 100: 3–6. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90110-F](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90110-F)

Cardona P, Wilkinson H. 2006. Trabajo en Equipo. IESE Occasional Papers. [Internet]. [citado el 20 marzo de 2022]; 7:10. Disponible en: <http://arodi.yolasite.com/resources/Trabajo%20en%20equipo-IESE.pdf>

- Castillo L, Ruepert C, Ramírez F, Van Wendel B, Bravo V, De la Cruz E. 2012. [Internet] Decimoctavo Informe Estado de la Nación en Desarrollo Humano Sostenible: Informe Final. Programa Estado de la Nación. [citado el 1 de enero de 2021]. Disponible en: <https://estadonacion.or.cr/informes/>
- [CDC] One Health Basics. [Internet]. 2018. (Estados Unidos) Gobierno Estados Unidos. [actualizado 7 de febrero de 2022; citado el 1 de diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>
- Celander MC. 2011. Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquat. Toxicol.* [Internet]. [citado el 7 de noviembre de 2021]; 105: 72-77. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X11001603>
doi: 10.1016/j.aquatox.2011.06.002
- Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* [Internet]. [citado el 10 setiembre 2021]; 65 (2): 232-260. Disponible desde: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mubr.65.2.232-260.2001>
- Colomer M, Imamovic L, Jofre J, Muniesa M. 2011. Bacteriophages carrying Resistance Genes in Fecal Waste from Cattle, Pigs, and Poultry. *Antimicrob Agents Chemoter.* [Internet]. [citado el 26 febrero de 2020]; 55(10): 4908–4911. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187014/>
- [COMEX] Ministerio de Comercio Exterior de Costa Rica. [Internet]. 2018. (Costa Rica). Desempeño General Comercio Exterior: Exportaciones 2018. [Citado el 26 de febrero 2020] Disponible desde:

<http://www.comex.go.cr/estad%C3%ADsticas-y-estudios/an%C3%A1lisis-econ%C3%B3mico/an%C3%A1lisis-sobre-la-evoluci%C3%B3n-de-las-exportaciones-de-costa-rica/>

Cota E, Hurtado L, Morales E, Alcántara L. 2014. Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. Rev. Ibe. Ci. [Internet]. [citado el 26 febrero de 2020]; 1 (1): 76-85. Disponible en: <http://www.reibci.org/publicados/2014/mayo/4569156.pdf>

Cruz C. 2020. Efecto de la aplicación de gallinaza de compostaje tradicional y comercial sobre las densidades de bacterias resistentes y los genes de resistencia a antibióticos en cultivo de rábano (*Raphanus sativus*) y lechuga (*Lactuca sativa*). Ecuador: Tesis para optar por el grado académico de Ingeniería Agrónoma. Universidad Técnica de Ambato.

Darpe K, Barner J, Hope A, Wilson AJ, Gubbins S, Henstock M, Frost L, Veronesi E, et al. 2016. Using shared needles for subcutaneous inoculation can transmit bluetongue virus mechanically between ruminant hosts. Sci. Rep. [Internet]. [citado el 4 octubre de 2021]; 6, 20627. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep20627>

Delfino CE, Gómez P, Costa L, Primel E, Fillmann G, Bianchini A, Bueno C. 2017. A comparative approach using biomarkers in feral and caged neotropical fish: Implications for monitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. Sci Total Environ. 586: 598-609.

- Dhama K, Chakraborty S, Kapoor S, Tiwari R, Kumar A, Deb R, Rajagunalan S, Singh R, Vora K, Natesan S. 2013. One world, One Health-Veterinary Perspectives. Academic Publishers. [Internet]. [citado: 27 de febrero de 2020]; 1 (1): 5–13. Disponible en: <http://www.nexusacademicpublishers.com/uploads/files/20130420082020.pdf>
- Dutta H, Arends D. 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ res.* [Internet]. [citado el 26 febrero de 2020]; 91 (3): 157-162. Disponible desde: [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(02\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(02)00062-2)
- Echeverría S, Mena F, Arias M, Vargas S, Ruepert C, Van den Brink PJ, Castillo L, Gunnarsson JS. 2018. In situ toxicity and ecological risk assessment of agro-pesticide runoff in the Madre de Dios River in Costa Rica. *Environ Sci Pollut Res Int.* [Internet]. [citado el 26 febrero de 2020]; 25 (14): 13270–13282. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7817-4>
- Ellman G, Courtney K. 1961. Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *BiochemPharm.* 7: 88-95.
- Eltaj H. 2010. Bacterial Contamination of Multi-Dose Veterinary Medication Vials in Dairy Cattle and Poultry Farms in Khartoum State. Khartoum, Sudan: (Tesis de Maestría). University of Khartoum. [Internet]. [citado el 26 octubre de 2021] Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/71671625.pdf>
- Errecalde J. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo, incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Italia, FAO. [Internet]. [citado el 07

de enero de 2021]. Disponible en:
<https://www.fao.org/publications/card/fr/c/811c0de8-2ed0-5692-8258-ca6f7c6cb29e/>

Esperbent C, Migliorati M. 2017. Bacterias multirresistentes: una amenaza oculta que crece. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires. Rev Investi Agropecu. 43 (1): 6-10.

Furness A, Hagmayer A, Pollux B. 2020. Size-dependent male mating tactics and their morphological correlates in *Poecilia gillii*. Biol.J.Linn. Soc. Lon. [Internet]. [citado el 26 noviembre de 2021]; 131, 880–897. Disponible en:
<https://pdfs.semanticscholar.org/3535/f53f18bc7c1ab95df5d782bcec0924328db5.pdf>

Galeano M. (ed.) 2018. Estrategias de investigación social cualitativa: el giro en la mirada. [Internet]. Medellín, Colombia: Fondo Editorial FCSH. [citado el 26 febrero de 2020]. Disponible en:
https://books.google.co.cr/books?hl=en&lr=&id=LxmMDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT6&dq=investigacion+social+con+distanciamiento+social&ots=5Yq7x_YkAo&sig=OvaqZwFalzbPCJf3GULAgfut4&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

García J. 1997. Consecuencias indeseables de los plaguicidas en el ambiente. Revista de Agronomía Mesoamericana. [Internet]. [citado el 26 febrero de 2020]; 8 (1): 119-135. Disponible en:
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/24747/24961>

- Gérvás J. 2000. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. Atención primaria. [Internet]. [citado el 10 de febrero 2022]; 25 (8): 589-596. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(00\)78573-8](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(00)78573-8)
- Giezy J, Solomon K, Coats J, Dixon K, Giddings J, Kenaga E. 1999. Chlorpyrifos: Ecological Risk Assessment in North American Aquatic Environments. Environ Contam Toxicol. (160): 1-129.
- Gil F. 2000. El Papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. Rev. Toxicol. [Internet]. [citado el 10 de mayo 2020]; 17 (1): 19-26. Disponible en: <https://www.ugr.es/~fgil/biomarcadoresrevtoxicol.pdf>
- Guilhermino L, Lopes M. C, Carvalho AP, Soared AM. 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. Chemosphere. 32 (4): 727-738.
- [IACG] Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance (IACG) [Internet]. 2019. Ginebra (Suiza). No podemos esperar: asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes. Informe para el Secretario General de las Naciones Unidas. [citado el 06 de enero de 2021]. Disponible desde: www.who.int
- [INCIENSA-UCR] Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (Costa Rica). [Internet]. 2011. Informe de vigilancia basada en laboratorio: Bacterias causantes de infecciones comunitarias de importancia en salud pública y su resistencia a los antimicrobianos. Costa Rica. [actualizado 6

de noviembre de 2019; citado el 07 de enero de 2021]. Disponible desde:
www.inciensa.sa.cr

[IRET-UNA] Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional de Costa Rica (Costa Rica). [Internet]. 2012. Heredia, Costa Rica. [citado el 28 de febrero 2020]. Disponible desde:
<http://www.orucbott.iret.una.ac.cr/index.php/historia>

[IRET-UNA] Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional de Costa Rica (Costa Rica). [Internet]. 2021. Manual de Plaguicidas de Centroamérica Heredia, Costa Rica. [citado el 3 de enero 2020]. Disponible desde: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/193-difenoconazol>

Jiménez K. 2019. Evaluación de efectos tóxicos tempranos tras la exposición de peces (*Parachromis dovii*) a una mezcla de clorpirifós y difenoconazol, a través de la respuesta de una batería de biomarcadores bioquímicos e histopatológicos. Heredia, C.R.: Tesis (Maestría). Universidad Nacional

Koehle V, Sohm B, Giamberini L, Pauly D, Flayac J, Devin S, Auffan M, Mouneyrac C, Pain S. 2019. A sub-individual multilevel approach for an integrative assessment of CuO nanoparticle effects on *Corbicula fluminea*. Environ. Pollut. [Internet]. [citado el 7 de noviembre de 2021]; 254. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112976>

Kunce W, Stoks R, Johansson F. 2017. Single and mixture impacts of two pyrethroids on damselfly predatory behavior and physiological biomarkers. Aquat. Toxicol.

- [Internet]. [citado el 7 de noviembre de 2021]; 190: 70-77. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.025>
- Lebrun J.D, De Jesus K, Rouillac L, Ravelli M, Guenne A, Tournebize J. 2020. Single and combined effects of insecticides on multi-level biomarkers in the non-target amphipod *Gammarus fossarum* exposed to environmentally realistic levels. *Aquat. Toxicol.* [Internet]. [citado el 7 de noviembre de 2021]; 218: 105357. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105357>
- Levine L, Oris, J. 1999. CYP1A expression in liver and gill of rainbow trout following waterborne exposure: implications for biomarker determination. *Aquat. Toxicol.* 46: 279–287.
- Lewis KA, Tzilivakis J, Warner D, Green A. 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* [Internet]. [citado el 10 de setiembre de 2021]; 22: 1050-1064. Disponible desde: <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- [MAG] Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. [Internet]. 2008. (Costa Rica). Buenas Prácticas Agropecuarias. [Citado el 26 de octubre 2021] Disponible desde: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/P01-4955.PDF>
- Masis F, Valdez J, Coto T, León S. 2008. Residuos de Agroquímicos en Sedimentos de Ríos, Poas, Costa Rica. *Agronomía Costarricense.* [Internet]. [citado el 2 de enero 2021]; 32 (1): 113-123. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6775>

- Mattar S, Calderón A, Sotelo D, Sierra M, Tordecilla G. 2009. Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *J. Public Health*. 11 (4): 579-590.
- Maximino C, Marques de Brito T, Gellis de Mattos Días C, Gouveia A, Morato S. 2010. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat. Protoc*. 5: 209-216.
- Mazzaro C. 2010. Comunicar la ciencia. Perspectivas, problemas y propuestas. *Psiencia Rev. Latinoam. Cienc. Psicol.* [Internet]. [citado el 10 de febrero 2022]; 2 (2): 122-127. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3406994>
- McEwen A, Collignon P. 2018. Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Micobiol Spectrum*. 6 (2): ARBA-0009-2017.
- Mena F, Azzopardi S, Clemens R, Tendergren L, Castillo L, Gunnarsson J. 2014a. Use of cholinesterase activity as a biomarker of pesticide exposure used on Costa Rican banana plantations in the native tropical fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). *J Environ Biol*. 35 (14): 35-42.
- Mena F, Fernandez M, Campos B, Sanchez J, Faria M, Pinnock M. de la Cruz E, Lacorte E, Barata C. 2014b. Pesticide residue analyses and biomarker responses of native Costa Rican fish of the Poeciliidae and Cichlidae families to asses environmental impacts of pesticides in Palo Verde National Park. *J Environ Biol*. 35: 19-27
- Minervini, MA. 2005. La infografía como recurso didáctico. *Rev Latina de Comunicación Social*. [Internet]. [Citado 8 de diciembre 2021]: 8 (59). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81985906>

- [Minsa] Ministerio de Salud de Costa Rica. [Internet]. 2021. (Costa Rica). Lineamientos General sobre uso mascarilla y caretas a nivel comunitario en el marco de la alerta por COVID-19. Versión: 010. [Citado el 30 de octubre 2021] Disponible desde: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/centro-de-prensa/noticias/741-noticias-2020/1532-lineamientos-nacionales-para-la-vigilancia-de-la-infeccion-por-coronavirus-2019-ncov>
- Montira J, Bickersteth S, Colon C, DeFries R, Dhaliwal M, Georgeson L, Haines A, Linou N, Murray V, Naeem S. 2019. Planetary Health: From concept to decisive action. *Lancet*. [Internet]. [Citado 8 de diciembre 2020]; 3 (10): 402-404. Disponible en: <https://www.thelancet.com/journals/lanplh/article/PIIS2542-51961930190-1/fulltext>
- Murillo M, Tobasura I. 2011. Tomadores de decisión en sistemas ganaderos de la cuenca alta del rio Guarino (Caldas, Colombia): Percepción de problemas ambientales y prácticas de conservación del agua. *Rev Luna Azul*. [Citado 29 de febrero 2020]; 33: 97-109. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3217/321727235009.pdf>
- Narváez J, Palacio J, Molina F. 2012. Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad: Una revisión de los procesos de degradación natural. *Gest Ambient*.15: 27-38.
- Navarro A, Casado M, Mena F, Pina B. 2014. Development of quantitative RNA biomarkers for detecting dioxin-like and estrogenic Pollutants in Costa Rican native fish species. *J Environ Biol*. 35: 99-105.

- [ODK] Open Data Kit [Internet]. 2020. (USA). ODK Features. Get ODK Inc. [citado 12 de noviembre 2020] Disponible desde: <https://getodk.org/#features>
- [OMS] Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2006. Ginebra (Suiza). Guía para la calidad del agua potable. [citado el 20 de octubre de 2021]. Disponible desde: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf
- [OMS] Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2018. Ginebra (Suiza). Desechos de Actividades de Atención Sanitaria. [citado el 01 de febrero de 2022]. Disponible desde: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/health-care-waste>
- [OMS] Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2020. Ginebra (Suiza). [citado el 06 de enero de 2021]. Disponible desde: www.who.int
- [ONU] Organización de las Naciones Unidas. [Internet]. 2020. New York (Estados Unidos) Preventing the next pandemic. Zoonotic diseases and how to break the chain of transmission. [citado el 10 de febrero de 2022]. Disponible desde: <https://www.unep.org/es/resources/report/preventing-future-zoonotic-disease-outbreaks-protecting-environment-animals-and>
- OpenCV. [Internet]. 2022. Open Source Computer Vision: Introduction. [citado el 25 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://docs.opencv.org/4.x/d1/dfb/intro.html>
- Oruç EÖ. 2010. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. Pestic Biochem Physiol. [Internet]. [citado el 26 febrero de 2020]: 96 (3): 160–166. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.11.005>

- Oszlak O. 2020. Trabajo Remoto: hacer de necesidad virtud. Cuadernos del INAP. Argentina. [Internet]. [Citado 20 de noviembre 2020]. Disponible en: <http://repositorio.cedes.org/bitstream/123456789/4566/1/CuadernosdelINAP2020%281%2930.pdf>
- Pagani H. 2011. O papel do médico veterinario na educação e formação na vigilância ambiental em Saude. REID. [Internet]. [Citado 29 de febrero 2020]. 1: 59-73. Disponible en: <https://revistaselectronicas.ujaen.es/index.php/reid/article/view/1139>
- Panthera [Internet]. 2015. Informe UACFel 2013-2015. (Costa Rica). [Citado 20 de octubre 2021]. Disponible en: <https://pantheracostarica.org/nuestros-proyectos/convivencia-felinos-ganado/>
- ParaView. [Internet]. 2022. ParaView platform in action. [Citado 25 de mayo 2022]. Disponible en: <https://www.paraview.org/>
- Paris A, Maino M, Duchens M. 2011. Prácticas de Bioseguridad Adoptadas en Grandes Explotaciones de Bovinos de Carne de la Zona Central de Chile. Avances en Ciencias Veterinarias. 26 (1): 78-93.
- Peters L, Porte C, Albaiges J, Livingstone D. 1994. 7-Ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme-activities in larvae of sardine (*Saedina pilchardus*) from the north coast of Spain. Mar Pollut Bull. 28 (5): 299-304.
- Prassana C. Anithasmruthi C. Venkatarathnamma V. 2020. A Study on Oxygen Consumption in Freshwater Fish *Labeo rohita* Exposed to Lethal and Sub

- Lethal Concentrations of Ethion 50% Ec. Indian J. Med. Forensic. 548 Med. Toxicol. 14: 122-127.
- Puvaca N, Llanos Frutos R. 2021. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans and Pet Animals. Antibiotics. 10: 2-19.
- Quiñones D. 2017. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". Revista Cubana de Medicina Tropical. [Internet]. [citado el 25 octubre de 2021]; 69 (3): 1-17. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009&lng=es&tlng=es.
- Ramey A, Alhstrom C. 2020. Antibiotic Resistant Bacteria in Wildlife: Perspectives on Trends, Acquisition and Dissemination, Data gaps, and Future Directions. J. Wildl. Dis. [Internet]. [citado el 28 octubre de 2021]; 56 (1): 1-15. Disponible en: <https://doi.org/10.7589/2019-04-099>
- R Core Team. [Internet]. 2020. R: a language and environment for statistical computing. URL. R Foundation for Statistical Computing. [citado el 25 mayo de 2022] Disponible en: <https://www.R-project.org/>.
- Redondo S, León AC, Jiménez K, Solano K, Blanco-Peña K, Mena F. 2021. Transient exposure to sublethal concentrations of a pesticide mixture (chlorpyrifos–difenoconazole) caused different responses in fish species from different trophic levels of the same community. Comp. Biochem. Physiol. Part C. 251 (2022) 109208

- Rivera J, Cedillo L. 2005. Evaluación de la resistencia a antibióticos de Enterobacterias aisladas en aguas contaminadas. *Rev Biomed.* 16: 151-152.
- Roberts M. 2005. Update in acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* [Internet]. [citado el 28 octubre de 2021]; 245 (2): 195-203 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034>
- Robinson P.D. 2009. Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* [Internet]. [citado el 28 febrero de 2020]; 66 (7): 1179-1188. Disponible en: <https://doi.org/10.1139/F09-069>
- Rodríguez C, Ingelman M. 2006. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* [Internet]. [citado 7 de febrero 2021]; 25, 1679-1691. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209377>
- Rojas I. 2014. Prevalencia y caracterización fenotípica y molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en superficies de contacto humano y animal en el Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica, durante los meses de mayo y junio del año 2013. Heredia, C.R.: Tesis (Licenciatura). Universidad Nacional.
- Rojas S. 2019. Evaluación de las prácticas de uso de antimicrobianos en fincas pecuarias alrededor de los parques nacionales Tortuguero y Los Quetzales de Costa Rica. Atenas, C.R.: (Seminario de Graduación). Universidad Técnica Nacional.

- Sandoval-Herrera N, Mena F, Espinoza M, Romero A. 2019. Neurotoxicity of organophosphate pesticides could reduce the ability of fish to escape predation under low doses of exposure. *Sci Rep-UK*. 9: 10530.
- Schlenk D, Celander M, Gallagher EP, George S., James M, Kullman SW, Van Der Hursk P, Willett K. 2008. Biotransformation in fishes. In: Di Giulio RT, Hinton DE. (Eds.). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press. 153–234.
- Scott GR, Sloman KA. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* [Internet]. [citado el 1 marzo de 2020]; 69 (4): 369-392. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>
- Sibley C, Chappel M, George T, Solomon K, Liber K. 2000. Integrating effects of stressors across levels of biological organization: examples using organophosphorus insecticide mixtures in field-level exposures. *J. Aquat Ecosys Stress Recovery*. 7: 117-130.
- Sloman K, McNeil P. 2012. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *J.Fish Biol.* [Internet]. [citado el 26 febrero de 2020]: 81 (7): 2175–2198. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03435.x>
- Stegeman J, Woodin B, Singh H, Oleksiak M, Celander M. 1997. Cytochromes P450 (CYP) in Tropical Fishes: Catalytic Activities, Expression of Multiple CYP Proteins and High Levels of Microsomal P450 in Liver of Fishes From Bermuda.

Comp Biochem Physiol. [Internet]. [citado el 26 febrero de 2020]; 116 (1): 61-75. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0742-8413\(96\)00128-4](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(96)00128-4)

Tabash F, Guadamuz E. 2000. A management plan for the sport fishery of *Parachromis dovii* (Pisces: Cichlidae) In Hule lake, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. [Internet]. [citado el 5 noviembre de 2021] 48 (2-3), 473-485. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-77442000000200019&lng=en&nrm=iso

Timofeva S, Bodiencova GM. 2021. Medical Waste as a Source of Antibiotic Contamination in Wastewater. Earth Environ. Sci. [Internet]. [citado el 26 setiembre de 2021]; 866. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/866/1/012014/meta>

Tubay V. 2020. La ganadería y su incidencia en la contaminación de fuentes de agua de la parroquia Sixto Duran Ballén. Manabí, Ecuador: Tesis (Ingeniería en medio ambiente). Universidad Estatal del Sur de Manabí.

Venegas A. 2019. Estudio preliminar de la influencia del manejo de efluentes en fincas productivas cercanas a los Parques Nacionales Tortuguero y Los Quetzales en la presencia de genes de resistencia a antibióticos reportados previamente en felinos silvestres. Atenas, C.R.: (Seminario de Graduación). Universidad Técnica Nacional.

Vrolijk N, Targett N, Woodin R, Stegeman J. 1994. Toxicological and ecological implications of biotransformation enzymes in tropical teleost *Chaetodon capistratus*, Mar. Biol. 119-151.

- Wan C, Lu G, Cui J, Wang P. 2009. Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 28: 414-419.
- Wang Y, Yang G, Dai D, Xu Z, Cai L, Wang Q, Yu Y. 2017. Individual and Mixture Effects of Five Agricultural Pesticides on Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *Environ Sci Pollut Res Int*. [Internet]. [citado el 26 febrero de 2020]; 24 (5): 4528–4536 Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8205-9>
- Wang X, Zong W, Xiao B, Qing L, Yang L, Covaci A, Zhu L. 2019. Bioavailability and biomagnification of organophosphate esters in the food web of Taihu Lake, China: Impacts of chemical properties and metabolism. *Sci Direct*. 125: 32-34.
- Yang R, Brauner C, Thurston V, Neuman, J, Randall D. 2000. Relationship between toxicant transfer kinetic processes and fish oxygen consumption. *Aquat. Toxicol*. [Internet]. [citado el 7 setiembre de 2021]; 48 (2-3), 95-108. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00050-8)
- Yang Y, Xinwen H, Wenjie L, Linfei L, Xindi L, Sincheng X. 2022. Abundance, diversity and diffusion of antibiotic resistance genes in cat feces and dog feces. *Environ Pollut*. [Internet]. [citado el 4 de octubre 2021]; 292. Part A. 1-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749121019461>
- Zhang L, Dong X, Wang C, Zuo Z, Chen M. 2017. Bioaccumulation and the expression of hepatic cytochrome P450 genes in marine medaka (*Oryzias melastigma*) exposed to difenoconazole. *J Environ Sci*. [Internet]. [citado el 26 febrero de 2020]; 52: 98–104. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.03.011>

Zinsstad J, Schellin E, Waltner-Toews D, Tanner M. 2011. From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and wellbeing. *Prev Vet Med.* [Internet]. [citado 29 de febrero 2020]; 101 (3-4): 148-156. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>

7. ANEXOS

Anexo #1. Evidencia del artículo científico producido a través de la pasantía en el Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) de la UNA.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 251 (2022) 109208



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpc



Research article

Transient exposure to sublethal concentrations of a pesticide mixture (chlorpyrifos–difenoconazole) caused different responses in fish species from different trophic levels of the same community

Sergei Redondo-López^a, Ana C. León^b, Katherine Jiménez^a, Karla Solano^a, Kinndle Blanco-Peña^a, Freylan Mena^{a,*}

^a Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Central American Institute for Studies on Toxic Substances (IRET), Costa Rica

^b Escuela de Medicina Veterinaria, School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional, Costa Rica



ARTICLE INFO

Edited by Martin Grosell

Keywords:

Parachromis dovii
Poecilia gillii
Pesticide mixtures
Behavior
Biotransformation
Neurotoxicity

ABSTRACT

The assessment of early effects caused in biota by sublethal exposure to pesticide mixtures should enhance the realism in the ecological risk assessment for agricultural landscapes. This study aimed to evaluate sub-individual responses in fish, which can be linked with outcomes at higher levels of biological organization and affect their trophic relationships. A multilevel biomarker approach was applied to assess the effects of a 48 h exposure of two freshwater mesoamerican fish species (*Parachromis dovii* and *Poecilia gillii*) to a mixture of sublethal concentrations of chlorpyrifos (5 µg/L) and difenoconazole (325 µg/L). Transcriptomic induction of *cyp1A* and the activities of 7-ethoxy-resorufin-O-distillase (EROD) and glutathione S-transferase (GST) were measured as biotransformation-related biomarkers; cholinesterase activity (ChE) was assessed as a neurotoxicity biomarker; resting metabolic rate (RMR) was measured as a physiological biomarker; and the movement of fish in a dark–light environment as a behavior biomarker. The exposure to the mixture had evident effects on *P. gillii*, with significant induction of *cyp1A* transcription, increased EROD activity, ChE inhibition in muscle, and increased permanence in the light side of the dark–light environment. Meanwhile, *P. dovii* only showed significant induction of *cyp1A*, without evidence of neurotoxicity or changes in behavior. This study demonstrates that the severity of the effects caused by the exposure to a mixture of pesticides can differ among species from the same trophic chain. The potential impairment of predator–prey relationships is a relevant effect that pesticide pollution can cause and it should be considered for the risk assessment of such contaminants.