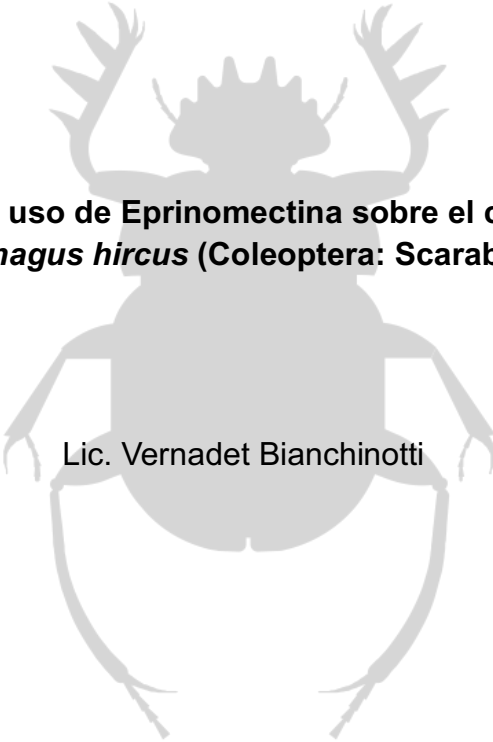


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS – FACULTAD DE VETERINARIA

Tesis para optar por el Título de Magíster en Ciencias Biológicas



**Impacto ecológico del uso de Eprinomectina sobre el coleóptero coprófago:
Onthophagus hircus (Coleoptera: Scarabaeidae)**

Lic. Vernadet Bianchinotti

Director de Tesis: Dr. Gonzalo Suárez Veirano

Co-Directora de Tesis: Patricia González Vainer

Montevideo, Uruguay
2022

*“...Dale vida a los sueños que tienes escondidos,
descubrirás que puedes vivir estos momentos
con los ojos abiertos y los miedos dormidos,
con los ojos cerrados y los sueños despiertos.”*

Mario Benedetti

Universidad de la República
Prograba de Desarrollo de las Ciencias Básicas
Área Biología, Subárea Zoología

Tesis presentada y aprobada como parte de los requisitos para la obtención del título de Magister en Ciencias Biológicas.

Director: Dr. Gonzalo Suárez

Co-Directora: Dra. Patricia González Vainer

Tribunal: Dres. Carmen Viera (Presidenta), Ciro Invernizzi y Carmen García y Santos (vocales)

Fecha: 24 de noviembre de 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores Gonzalo y Patricia, por enseñarme, formarme y haber transitado conmigo este camino de crecimiento personal y profesional. Y también por toda la paciencia.

Al tribunal, Carmen, Ciro y Carmen, por aceptar ser parte del mismo, las correcciones, comentarios y aportes que me enriquecieron, ayudaron a mejorar y ver las cosas desde otras perspectivas.

A la Facultad de Ciencias y Facultad de Veterinaria, Instituciones donde fue realizado el proyecto.

Al Campo Experimental del Insituto de Higiene y su Director Dr. Pablo Alonzo por brindarme un espacio para la coelcta de escarabajos que permitió llevar a cabo este trabajo.

A mis compañeros de la Unidad de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Veterinaria, que acompañaron, apoyaron y se bancaron el olor de “caca de vaca”.

A mi familia por el eterno apoyo incondicional, siempre estar presentes y permitirme llevar adelante mis sueños. A Rosario y el Tano por tanto amor y el apoyo continuo, y por sobre todo incalculables besos y abrazos que llenan con esa hermosa energía. A Karen y Marcelino por siempre estar ahí. Al Cucho y Nano, porque cada vez que tienen alguna duda que involucre “bichos”, naturaleza o biología preguntan a la Titi. Y si no tengo ni idea intento buscar la respuesta y aprendo con ellos.

Al Rata y la pequeña Medusa, por apoyarme y brindarme mi espacio para poder llevar adelante este trabajo y por sobre todo ese inmenso amor y alegría.

A todas aquellas personas que de una manera u otra colaboraron todos estos años para que pudiera llevar adelante mi formación. Y en especial a Valen, el Kbza y Nashi-ou, que estuvieron ahí aconsejando, escuchando y aguantaron mis locuras en momentos de estrés con muchos abrazos y hermosas palabras.

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE TABLAS.....	IV
LISTA DE FÓRMULAS.....	V
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
Lactonas macrocíclicas.....	3
Lactonas macrocíclicas, medio ambiente y especies coprófagas.....	3
Coleópteros coprófagos.....	5
El problema de investigación.....	7
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
CAPÍTULO I: Validación de un modelo de cría en laboratorio de <i>Onthophagus hircus</i> (Coleoptera: Scarabaeidae).....	9
Introducción.....	9
Importancia de los coleópteros coprófagos.....	9
Sujeto de estudio <i>Onthophagus hircus</i>	10
Modelos de cría en laboratorio.....	10
Objetivo específico.....	10
Materiales y métodos.....	11
Recolección de individuos y acondicionamiento (F0).....	11
Núcleo inicial (F1).....	12
Indicadores de desempeño reproductivo.....	13
Tamaño corporal de las hembras.....	13
Dimensiones de las masas-nido.....	13
Fecundidad de las hembras.....	14
Tasa de emergencia.....	14
Tiempo de desarrollo post embrionario.....	15
Tamaño corporal de la progenie.....	15
Análisis estadístico.....	15
Resultados.....	16
Tamaño corporal de las hembras.....	16
Dimensiones de las masas-nido.....	17
Fecundidad de las hembras.....	18
Tasa de emergencia.....	19
Tiempo de desarrollo post embrionario.....	20
Tamaño corporal de la progenie.....	22
Principales aportes.....	23
CAPÍTULO II: Primera aproximación al efecto de Eprinomectina en materia fecal bovina sobre el desempeño reproductivo de <i>Onthophagus hircus</i>	24
Introducción.....	24

Eprinomectina.....	24
Objetivo específico.....	25
Materiales y métodos.....	25
Preparación de las soluciones de trabajo.....	25
Individuos y acondicionamiento.....	26
Grupo control (GC).....	26
Grupo tratamiento (GT).....	26
Indicadores de desempeño reproductivo.....	26
Tiempo medio de sobrevida.....	27
Análisis estadístico.....	27
Resultados.....	28
Tamaño corporal de las hembras.....	28
Dimensiones de las masas-nido.....	29
Fecundidad de las hembras.....	30
Tasa de emergencia.....	31
Tiempo de desarrollo post embrionario.....	32
Tamaño corporal de la progenie.....	33
Tiempo medio de sobrevida.....	34
Principales aportes.....	36
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	41
COMUNICACIONES CIENTÍFICAS	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS POR ORDEN DE APARICIÓN

NGI: Nemátodos gastrointestinales

LM: Lactonas macrocíclicas

EPM: Eprinomectina

MF: Materia fecal

MN: Masa-nido

F0: Individuos recolectados en campo

F1: Primera generación de individuos nacida en el laboratorio (progenie de F0)

F2: Segunda generación de individuos nacida en laboratorio (progenie de F1)

CV: Coeficiente de variación

IC₉₅: Intervalo de confianza del 95 %

GC: Grupo control

GT: Grupo tratamiento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colecta manual de individuos adultos de forma directa en materia fecal de bovinos pastoreando a campo natural.

Figura 2. A. Terrario plástico para acondicionamiento individual de las masas-nido. **B.** Terrarios de masas-nido acondicionados en insectario.

Figura 3. A. Terrario de vidrio con mezcla de arena:vermiculita y alimento, para parejas de adultos de *Onthophagus hircus* sin la pared móvil. **B.** Terrarios de vidrio acondicionados en insectario.

Figura 4. Gráfico de dispersión para el tamaño corporal de las hembras de *Onthophagus hircus* por grupo experimental, F0 y F1. Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Figura 5. Gráficos de dispersión para: **A.** Volumen (cm³) de las masas-nido de F0 (MN-F0, progenitores recolectados en campo) y masas-nido de F1 (MN-F1, progenitores nacidos en el laboratorio); **B.** Peso (gr) de las masas-nido de cada grupo, MN-F0 y MN-F1; **C.** Gráfico de correlación entre peso (g) y volumen (cm³) de las masas-nido para cada grupo, MN-F0 y MN-F1. Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Figura 6. A. Gráfico inverso del tiempo de emergencia de los imagos de cada grupo experimental, F1 y F2. **B.** Gráfico inverso del tiempo de emergencia de los imagos por terrario del grupo F1. **C.** Gráfico inverso del tiempo emergencia de los imagos por terrario del grupo F2. La línea representa la probabilidad de emergencia a cada tiempo determinado y la sombra el IC₉₅ (intervalo de confianza del 95 %).

Figura 7. Gráfico de dispersión para el tamaño corporal de la progenie de *Onthophagus hircus* por grupo experimental, F1 y F2. Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Figura 8. Gráfico de dispersión para el tamaño corporal de las hembras de *Onthophagus hircus* por grupo experimental, grupo control (GC) y grupo tratamiento (GT). Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Figura 9. Gráfico de dispersión para: **A.** Volumen (cm³) de las masas-nido del grupo control (GC) y masas-nido del grupo tratamiento (GT) y **B.** Peso (gr) de las masas-nido de cada grupo, GC y GT; **C.** Gráfico de correlación entre el peso (g) y el volumen (cm³) de las masas-nido para cada grupo, GC y GT. Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Figura 10. Gráfico inverso del tiempo de emergencia de los imagos para cada grupo experimental, grupo control (GC) y grupo tratamiento (GT). La línea representa la probabilidad de emergencia a cada tiempo determinado y la sombra el IC₉₅ de la misma.

Figura 11. Gráfico de dispersión para del tamaño corporal de la progenie de *Onthophagus hircus* por grupo experimental, grupo control (GC) y grupo tratamiento (GT). Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Figura 12. Curva de sobrevivencia para los distintos grupos experimentales (control, 0,05 ppm, 0,5 ppm, 5 ppm y 50 ppm de Eprinomectina). La línea representa la probabilidad de emergencia a cada tiempo determinado y la sombra el IC₉₅ (intervalo de confianza del 95 %).

Figura 13. Estado de compactación de la materia fecal luego de 48 hs de disponibilidad como alimento a los individuos y previo al recambio del mismo para los distintos grupos experimentales, **A.** control; **B.** 0,05; **C.** 0,5; **D.** 5 y **E.** 50 ppm de Eprinomectina.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fecundidad para los terrarios de F1 respecto a las hembras (fec1) y en función de la proporción sexual (fec2).

Tabla 2. Cantidad de masas-nido y Tasa de emergencia por terrario para cada grupo experimental, F1 y F2.

Tabla 3. Tiempo medio de emergencia por grupo experimental, F1 y F2, e intervalo de confianza del 95 % (IC₉₅).

Tabla 4. Fecundidad por terrario para cada grupo experimental, grupo control (GC) y grupo tratamiento (GT), respecto a las hembras (fec1) y en función de la proporción sexual (fec2).

Tabla 5. Cantidad de masas-nido y tasa de emergencia por terrario para cada grupo experimental, grupo control (GC) y grupo tratamiento (GT).

Tabla 6. Tiempo medio de supervivencia para Eprinomectina por grupo experimental (control, 0,05 ppm, 0,5 ppm, 5 ppm y 50 ppm de Eprinomectina) para un período de 7 días.

LISTA DE FÓRMULAS

Ecuación 1. Volumen corporal (mm^3) calculado usando la fórmula de volumen de un cilindro: $V = \pi r^2 h$, donde $(\text{ancho}/2)^2$ es el radio al cuadrado y el largo es la altura.

Ecuación 2. Volumen de las masas-nido (cm^3) calculado usando la fórmula de volumen de un cilindro (ver Ecuación 1).

Ecuación 3. Fecundidad **fec1**: fecundidad de las hembras por terrario (MN/h).

Ecuación 4. Fecundidad **fec2**: fecundidad de las hembras en función de la relación hembras-machos para cada terrario $[(\text{MN}/h)/(\text{h}/m)]$.

Ecuación 5. Tasa de emergencia (%) calculada como el cociente entre el total de los imagos emergidos y el total de las MN registradas para cada terrario y grupo experimental.

RESUMEN

En Uruguay, los nemátodos gastrointestinales (NGI) y el impacto negativo producto de su parasitosis cobra particular relevancia dado que afecta a los sistemas productivos. El perjuicio causado por estos parásitos es una de las principales limitantes sanitario-económicas de los sistemas pecuarios de rumiantes en Uruguay. Para combatir estos parásitos se utilizan las lactonas macrocíclicas (LM) como alternativa química que puede ser instrumentada en diferentes formulaciones farmacotécnicas. La aplicación de LM en sus distintas alternativas farmacotécnicas presentan niveles variables de concentración persistentes en heces, con potenciales impactos negativos sobre el ambiente. Dentro de las LM, Ivermectina ha sido el activo con mayores estudios de impacto ambiental, existiendo escasa información para otros activos como ser Eprinomectina (EPM). Experiencias en laboratorio comprobaron efectos letales de las LM sobre algunas especies de coleópteros coprófagos en adultos y efectos subletales sobre la progenie. El coleóptero coprófago *Onthophagus hircus*, es un paracóprido ampliamente distribuido en praderas de Uruguay. La interacción coleópteros coprófagos - estiércol y el accionar de estas especies favorece las condiciones físicas y químicas del suelo, influyendo positivamente en el crecimiento y producción de materia seca de las plantas forrajeras. A pesar de la importancia mencionada no hay estudios que evalúen los efectos específicos de la EPM sobre las especies coprófagas nativas y sobre el proceso de desintegración del estiércol. El objetivo de la presente tesis fue evaluar la cría en laboratorio del coleóptero coprófago *O. hircus* y la realización de ensayos en condiciones controladas que permitan analizar el efecto de EPM presente en materia fecal (MF) sobre el desempeño reproductivo de dicha especie. Se recolectaron adultos de *O. hircus* manualmente en MF fresca de bovinos pastoreando en campo natural. Hembras y machos fueron acondicionados en terrarios plásticos con una mezcla de arena húmeda y vermiculita a 24 °C y 12 h luz. Semanalmente se les proporcionó 150 g de MF fresca de bovinos libre de antihelmínticos. Se extrajeron las masas-nido (MN), se midieron, pesaron y acondicionaron en terrarios plásticos hasta la emergencia de los adultos (F1). Parejas de F1 fueron acondicionadas en terrarios de vidrio, en las mismas condiciones, revisando semanalmente, hasta la muerte de las hembras. Se determinó la fecundidad de las hembras y la sobrevivencia de los imagos F1, así como el tiempo de desarrollo (desde la puesta del huevo hasta la emergencia del imago) y la tasa de supervivencia (de huevo a adulto). Los imagos emergidos (F2) se midieron para evaluar el tamaño de la progenie. Parejas de F2 se acondicionaron igual que los adultos F1, pero se

les proporcionó MF bovina fresca fortificada con EPM (0,05 ppm), recabando la misma información de F1. Se utilizaron además 5 grupos de adultos recolectados a los que se les proporcionó el día 1, 3 y 5, 50 g de MF fortificada a concentraciones de 0; 0,05; 0,5; 5 y 50 ppm de EPM, donde se contabilizaron las muertes, realizando un conteo final al día 7 para determinar el tiempo medio de supervivencia. Los principales resultados observados fueron que bajo condiciones óptimas y controladas es factible la cría en laboratorio del coleóptero coprófago *O. hircus* permitiendo disponer de una generación apta para la realización de ensayos de ecotoxicidad. A pesar de que la F2 realizó sus actividades de alimentación y reproducción dentro de los parámetros establecidos, la presencia de EPM en MF (0,05 ppm) afectó la progenie y las futuras generaciones de la población, presentando efectos letales sobre las MN de dicho grupo. Únicamente la concentración de 50 ppm de EPM en MF representó un efecto negativo en la supervivencia de los adultos, con un tiempo medio de sobrevivencia de 7 días luego de la exposición a MF con EPM. La presente tesis brinda información original y relevante para la situación agropecuaria, aportando información ecológica-ambiental de los potenciales efectos deletéreos de la EPM sobre la comunidad coprófaga y su consecuente efecto en la salud de las praderas y el ganado.

Palabras clave

Escarabajos estercoleros, Estiércol, Rumiantes, Lactonas macrocíclicas, Ecotoxicidad

INTRODUCCIÓN GENERAL

Lactonas macrocíclicas

En los sistemas pecuarios, las enfermedades parasitarias constituyen uno de los problemas sanitarios con mayores pérdidas económicas (Waller 2006; Wolstenholme *et al.* 2004). Una de ellas es la parasitosis gastrointestinal causada por nemátodos, que produce un impacto negativo sobre los rumiantes. Los efectos de los NGI varían de acuerdo a la patogenicidad del parásito considerado, la carga parasitaria, la categoría animal, y el estado nutricional y fisiológico de los animales parasitados.

El control parasitario en animales puede ser químico (fármacos antiparasitarios) o por otros métodos como control biológico, selección genética, vacunas, manejo operacional. El método más utilizado es el químico, sin embargo, el desarrollo masivo de resistencia antihelmíntica ha determinado cambios en las estrategias farmacológicas. Los benzimidazoles, los imidazotiazoles y las LM son las principales alternativas terapéuticas de mayor utilización en el control de NGI en bovinos (Riviere & Papich 2009).

En la región cobra particular relevancia el impacto negativo de las parasitosis gastrointestinales, que afectan a los sistemas productivos (Molento 2020). Los NGI son una de las principales limitantes sanitario-económicas de los sistemas pecuarios en rumiantes en Uruguay (Fiel & Nari 2013). Para su control, las LM, ivermectina, doramectina y EPM son una de las alternativas terapéuticas más utilizadas.

Lactonas macrocíclicas, medio ambiente y especies coprófagas

Las LM pueden ser utilizadas mediante formulaciones de liberación prolongada (LA: larga acción), no obstante presentan como inconveniente niveles de concentración persistentes en heces, con impactos negativos sobre el ambiente. Dentro de las LM, ivermectina ha sido la droga principalmente estudiada, y analizado el impacto negativo que provoca en el ambiente (Jacobs & Scholtz 2015), y existen escasos reportes sobre EPM. Los bovinos dosificados con ivermectina o EPM eliminan residuos mediante la MF que son potencialmente deletéreos para los insectos que habitan en el estiércol, incluyendo las especies que aceleran su desintegración (Adler *et al.* 2016). Los residuos de antihelmínticos

presentes en la MF del ganado tratado, reducen la actividad de las especies coprófagas por semanas y hasta por meses luego de su aplicación, retardando marcadamente la descomposición e incorporación de los excrementos al suelo. Esta demora provoca la acumulación fecal en las pasturas con detrimento de la calidad de los suelos ya que los residuos no se degradan hasta que el estiércol es incorporado al suelo (Floate 2006). La vida media de los residuos en los excrementos es de 45 a 80 días dependiendo de la droga (Floate 2006; Halley *et al.* 1993; Sommer & Steffansen 1993). En el caso de la EPM aplicada como *pour-on*, la concentración máxima de residuos se encuentra en los excrementos dentro de los 3 días posteriores a su aplicación y permanece hasta el día 29 (Lifschitz *et al.* 2016; Lumaret *et al.* 2005).

Estudios a nivel internacional demuestran que la intensificación actual de algunas prácticas agrícolas-ganaderas como aplicación de herbicidas, fertilizantes sintéticos y antiparasitarios, afectan la estructura de las comunidades coprófagas (De Farias *et al.* 2015; Martínez & Cruz 2009; Lumaret *et al.* 2005; Hutton & Giller 2003; Martínez *et al.* 2001). Residuos de ivermectina presentes en MF de bovinos, afecta a las comunidades coprófagas causando una reducción en la diversidad, abundancia y biomasa de especies (Jochmann & Blanckenhorn 2016; Basto-Estrella *et al.* 2014; Sutton *et al.* 2014; Errouissi & Lumaret 2010; Floate 2006; Hutton & Giller 2003). El impacto de los residuos varía dependiendo de la región, manejo del ganado y estaciones del año, las especies de la comunidad del estiércol también son afectadas en distinto grado por dichos residuos (Jochmann & Blanckenhorn 2016).

Experiencias de laboratorio han comprobado que tanto la ivermectina como la doramectina tienen efectos letales sobre algunas especies de coleópteros coprófagos en su estado adulto, y efectos subletales sobre la reproducción y tiempos de desarrollo post embrionario (De La Vega *et al.* 2014; Cruz Rosales *et al.* 2012; O’Hea *et al.* 2010; Iwasa *et al.* 2007; Iwasa *et al.* 2005; Wardhaugh *et al.* 2001). La ivermectina también causa desórdenes subletales en el sistema sensorial y locomotor de los escarabajos adultos, disminuyendo sus capacidades olfativa y locomotriz afectando sus actividades biológicas básicas (Verdú *et al.* 2015). Estos efectos han sido observados en concentraciones más bajas de las que usualmente se miden en los excrementos de animales tratados con dicha droga (Verdú *et al.* 2015).

Coleópteros coprófagos

Los escarabajos coprófagos son un grupo de coleópteros Scarabaeidae con aproximadamente 7.000 especies en todo el mundo (Hanski & Cambefort 1991). En el Neotrópico se conocen unas 4.000 especies de las cuales aproximadamente 100 se han registrado en Uruguay (Monné 1978). Estos insectos se alimentan, en estado adulto, del componente líquido, rico en microorganismos, de los excrementos de mamíferos herbívoros principalmente y usan la porción fibrosa para alimentar a sus larvas (Halffter & Edmonds 1982). Mediante distintas estrategias comportamentales, los adultos utilizan el estiércol como alimento, así como para construir nidos para la progenie. Se distinguen tres grupos funcionales: cavadores, rodadores y endocópridos, según la forma en que utilizan el estiércol. Los cavadores excavan galerías en el suelo y las rellenan de estiércol para alimentarse del mismo y/o para construir bolas o MN para depositar los huevos. Los rodadores elaboran bolas de excremento, las ruedan y las entierran a distancia, mientras que los endocópridos desarrollan todo su ciclo de vida dentro del estiércol, contribuyendo a su desintegración *in situ*. La cantidad de excremento enterrado y/o desintegrado depende de diversos factores como el tamaño de los individuos y abundancia, tipo y humedad del suelo, calidad del alimento (Nichols *et al.* 2008). Los grandes cavadores y rodadores (≥ 10 mm) entierran mayores cantidades de estiércol que las especies pequeñas (< 10 mm) de su mismo gremio y que los endocópridos, típicamente pequeños (Hanski & Cambefort 1991). Consecuentemente, la presencia de los tres grupos funcionales, maximiza la función ecosistémica (Slade *et al.* 2007).

La interacción coleópteros coprófagos - estiércol recicla los nutrientes contenidos en los excrementos (ej: fósforo y nitrógeno) incorporándolos al suelo y manteniendo la fertilidad de los mismos. Si el estiércol no es removido, el 80 % del nitrógeno se pierde por volatilización. La acción de los coleópteros coprófagos crea un ambiente aeróbico que promueve la acción de las bacterias en el proceso de mineralización de nitrógeno, lo cual aumenta la productividad del suelo (Kazuhira *et al.* 1991; Gillard 1967). Además, el enterramiento del estiércol incrementa la aireación del suelo, mejorando su permeabilidad al agua (Brown *et al.* 2010) y a los nutrientes (Bang *et al.* 2005). Bertone (2004) demostró que la actividad de enterramiento tiene un impacto positivo sobre los nutrientes del suelo, el pH y la capacidad de intercambio de cationes, que influye positivamente en el crecimiento y producción de materia seca de las plantas forrajeras. Por otra parte se reduce la emisión de gases de efecto invernadero como CO₂ y metano entre el 40 % y 64 % (Verdú *et al.*

2020), cuyas concentraciones en el estiércol van del 20 al 50 % (Bang *et al.* 2005). En los sistemas pastoriles, cada bovino produce aproximadamente 10-20 deyecciones diarias, cubriendo, cada una, una superficie de aproximadamente 0,82 m² de área. Cada placa de excremento puede permanecer sobre la superficie hasta 4 años en ausencia de coleópteros coprófagos (Bang *et al.* 2005). Si bien otros organismos como las lombrices y termites pueden desintegrar el estiércol, los coleópteros coprófagos incrementan significativamente la tasa de descomposición (Holter 1979). Se ha comprobado que los bovinos no pastorean en las zonas circundantes a sus propias heces. Adicionalmente, el excremento no degradado impide el crecimiento de la vegetación subyacente causando pérdida significativa del área útil de pastoreo por casi dos años (Miranda *et al.* 2000). A través del enterramiento del estiércol los coprófagos cumplen servicios ambientales importantes y económicamente beneficiosos para los sistemas agrícolas-ganaderos (Manning *et al.* 2016; De Groot *et al.* 2002), incrementando el área útil de pastoreo de un 5 a 10 % por hectárea (Bang *et al.* 2005).

El estiércol también constituye un sustrato para la reproducción de plagas como la mosca del cuerno y para el desarrollo de helmintos parásitos del ganado. La actividad de los coprófagos puede reducir las poblaciones de esta mosca (Legner & Warkentin 1991) y el número y la migración de larvas de helmintos parásitos dentro de las heces (Gregory *et al.* 2015; Nichols & Gómez 2014). Muchos parásitos de bovinos tienen parte de su ciclo de desarrollo en las bostas, particularmente los helmintos gastrointestinales, causando serios perjuicios económicos. Los huevos de la mayoría de ellos salen junto a las bostas, desde donde emergen las larvas que contaminan la pradera, infectando nuevamente los animales, completando su ciclo de vida. La eficiencia en el control biológico de estos parásitos depende de varios factores, donde la presencia de escarabajos coprófagos es fundamental. La actividad de enterramiento del estiércol por una especie de escarabajo puede reducir el número de larvas de un nemátodo hasta un 88 % (Grønvold *et al.* 1992).

El importante papel en el control biológico de moscas y parásitos gastrointestinales en rumiantes, así como en la sustentabilidad de las praderas de los coleópteros coprófagos amerita la aplicación de manejos adecuados que aseguren la conservación de sus poblaciones.

El problema de investigación

En Uruguay, alternativas farmacotécnicas de aplicación de LM en bovinos son utilizadas sin conocimiento sobre su efecto en las comunidades coprófagas. Específicamente la EPM puede ser utilizada mediante una formulación de liberación prolongada (Forbes 2013). Esta modalidad de uso presenta impactos negativos sobre el ambiente por los altos niveles de concentración persistentes en las heces. No obstante, existe escasa información sobre los efectos ecotóxicos del principio activo, salvo escasos antecedentes en la región. Un estudio en Australia, indica que la EPM aplicada en forma de *pour-on* produce en una especie de escarabajo coprófago, alta mortalidad de adultos, reduce la fecundidad de los sobrevivientes y sobrevivencia de los inmaduros (Wardhaugh *et al.* 2001). En Francia, demostraron el efecto larvicida de los residuos sobre una especie de mosca que se desarrolla en el estiércol (Lumaret *et al.* 2005). Cuando consideramos la vía de administración, estudios publicados por Aksit *et al.* (2016), revelan que la administración subcutánea de EPM al 1 % generó mayores concentraciones plasmáticas y una mayor disponibilidad en plasma en comparación con la administración tópica en bovinos no lactantes. Aunque la ruta subcutánea proporciona concentraciones fecales más altas, la mayor persistencia fecal de EPM después de la administración tópica puede resultar en una mayor eficacia persistente que impide el establecimiento de larvas de NGI en los bovinos.

En Uruguay y en la región, no se reportan estudios que evalúen los efectos que los tratamientos con EPM puedan tener sobre las especies coprófagas nativas y sobre el proceso de desintegración del estiércol. En la actual situación agropecuaria, es de relevancia generar información ecológica-ambiental sobre la degradación del estiércol y los potenciales efectos deletéreos de la EPM sobre la comunidad coprófaga.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La presencia de Eprinomectina en materia fecal bovina afectaría el desempeño reproductivo del coleóptero coprófago *Onthophagus hircus* (Scarabaeidae).

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las concentraciones de Eprinomectina en materia fecal bovina sobre el desempeño reproductivo y el tiempo de sobrevivencia del coleóptero coprófago *Onthophagus hircus*.

CAPÍTULO I: Validación de un modelo de cría en laboratorio de *Onthophagus hircus* (Coleoptera: Scarabaeidae)

Introducción

Importancia de los coleópteros coprófagos

En la mayoría de los ecosistemas de pastoreo, hasta el 85 % de la producción primaria de pastos puede ser consumida por grandes herbívoros (Olechowicz 1974). Este consumo de materia orgánica se transforma principalmente en estiércol, lo que representa un potencial cuello de botella en el proceso de reciclaje si no es descompuesto por la microflora y numerosos invertebrados que de él se alimentan (Lumaret & Bertrand 1985). La desaparición del estiércol de la superficie del suelo depende de factores físicos como entre otros, tipo de clima y grado de pluviosidad (Bastiman 1970; White 1960) y de procesos biológicos. Teniendo en cuenta el papel vital en cualquier ecosistema de pastoreo de los escarabajos estercoleros (Lumaret & Kirk 1987), se debe considerar la cantidad de excremento enterrado y/o desintegrado que depende indirectamente de diversos factores como tamaño de los individuos, abundancia, tipo y humedad del suelo, y la calidad del alimento disponible (Nichols *et al.* 2008).

Mediante la desintegración y enterramiento del estiércol, los coleópteros coprófagos desempeñan funciones ecológicas como el reciclamiento de nutrientes, que derivan en servicios ambientales importantes y económicamente beneficiosos para los sistemas agrícolas-ganaderos (Manning *et al.* 2016; De Groot *et al.* 2002). Estos servicios incluyen la mejora de las propiedades físicas y químicas del suelo, el incremento de la producción de materia seca de las plantas, la dispersión secundaria de semillas y la disminución de parásitos (moscas y helmintos) que se desarrollan en las heces (Manning *et al.* 2016; Brown *et al.* 2010; Nichols *et al.* 2008; Bang *et al.* 2005; Kazuhira *et al.* 1991; Gillard 1967). Como consecuencia de estas funciones y servicios, el área útil de pastoreo puede sufrir un incremento de un 5 a 10 % por hectárea (Bang *et al.* 2005).

Sujeto de estudio: *Onthophagus hircus*

El coleóptero coprófago *Onthophagus hircus*, es una especie cavadora (paracóprida) que se encuentra ampliamente distribuida en ambientes de pradera en Uruguay. La actividad de los adultos en el campo se extiende desde la primavera hasta el otoño y las poblaciones suelen ser abundantes en excretas de vacunos, ovinos y equinos (González-Vainer *et al.* 2012; Morelli *et al.* 2002). Es una especie de pequeño tamaño (5-7 mm) con dimorfismo sexual, desarrollo post embrionario corto (45 días) y período de un mes para maduración de las hembras (González-Vainer & Morelli 1999). Estas características de la especie permiten que sea utilizada como un modelo adecuado para desarrollar un protocolo de cría y experiencias de laboratorio, en comparación con otras especies coprófagas de mayor tamaño con tiempos de maduración y de desarrollo más largos (7 y 3 meses, respectivamente) (Morelli *et al.* 1996).

Modelos de cría en laboratorio

En general, la metodología de cría en laboratorio en condiciones controladas de especies de coleópteros coprófagos se ha utilizado inicialmente para investigar los efectos que los residuos de LM en MF aplicadas en rumiantes puedan tener sobre dichas especies (De La Vega *et al.* 2014; Cruz Rosales *et al.* 2012; O'Hea *et al.* 2010; Iwasa *et al.* 2007; Iwasa *et al.* 2005; Wardhaugh *et al.* 2001). En Uruguay, la cría en laboratorio de *O. hircus* ha sido utilizada con el fin de determinar su ciclo de vida y patrón de nidificación (González-Vainer & Morelli 1999). Pero la cría en laboratorio bajo condiciones controladas de *O. hircus* es factible de ser utilizada además, para determinar modelos de cría que permitan la realización de ensayos tóxico-ambientales.

El presente trabajo pretende determinar las pautas para implementar un modelo biológico de cría en laboratorio bajo condiciones controladas del coleóptero coprófago *O. hircus* para ser utilizado como modelo para otras investigaciones.

Objetivo específico

Puesta a punto de una metodología de cría en laboratorio de *Onthophagus hircus* para la implementación de bioensayos.

Materiales y métodos

Recolección de individuos y acondicionamiento (F0)

La recolección de individuos adultos de *O. hircus* fue realizada durante el período estival de forma manual directa en MF de bovinos pastoreando en campo natural. Los individuos recolectados (F0) se acondicionaron en el laboratorio en terrarios de 30 cm de diámetro y 20 cm de altura. Los terrarios fueron acondicionados con una mezcla compactada de arena húmeda y vermiculita (2:1), hasta una profundidad de 15 cm; y fueron mantenidos en un insectario a temperatura ambiente promedio de $24,1 \pm 1,8^{\circ} \text{C}$ y un fotoperiodo de 12 hs luz. Fueron alimentados semanalmente con MF fresca proveniente de bovinos sin tratamiento con antihelmínticos en las últimas 6 semanas. Asimismo, se revisaron para extraer las MN, que fueron acondicionadas individualmente en terrarios plásticos y cubiertas con tierra húmeda para evitar la desecación hasta la emergencia de los adultos F1 (primera generación nacida en laboratorio) (Figura 1). Previo al acondicionamiento de las MN, se midieron largo y ancho con calibre digital de resolución $\pm 0,01 \text{ mm}$ (Kendo, China) y se pesaron en balanza de precisión $\pm 0.001 \text{ g}$ (WTB2020, EUA). A partir de los 30 días de su acondicionamiento se realizó un control semanal hasta la emergencia del imago. Una vez cumplidos los 120 días desde la fecha de colecta, las MN cerradas fueron abiertas para su inspección y determinar si eran MN que no culminaron su ciclo o masas de alimentación.



Figura 1. Colecta manual de individuos adultos de forma directa en materia fecal de bovinos pastoreando a campo natural.

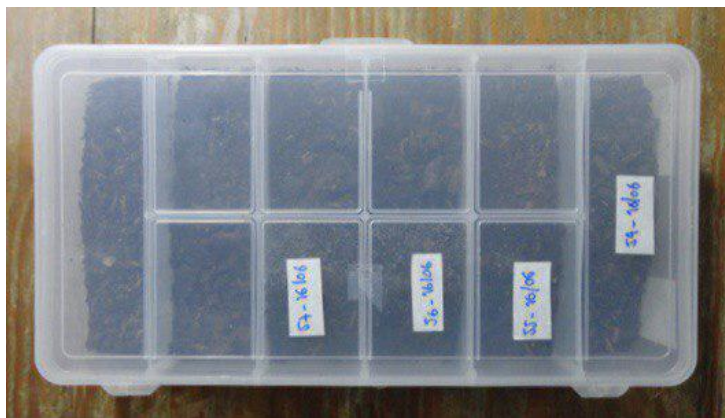


Figura 2. A. Terrario plástico para acondicionamiento individual de las masas-nido. **B.** Terrarios de masas-nido acondicionados en insectario.

Núcleo inicial (F1)

En base a la metodología de González-Vainer & Morelli (1999) los individuos adultos de la F1 se acondicionaron en terrarios de vidrio de 34 cm de largo, 2,5 cm de ancho y 30 cm de altura con una de las paredes móvil para favorecer la extracción de las MN y el recambio de alimento. Los terrarios contuvieron una mezcla compactada de arena húmeda y vermiculita (2:1) hasta una profundidad de 15 cm, cubriendo sus paredes con una cubierta plástica negra para impedir el pasaje de luz y así simular las condiciones de enterramiento, se cubrió la superficie con una malla-red para impedir el vuelo de los adultos. Los terrarios fueron mantenidos en un insectario en las condiciones de temperatura y luz descritas anteriormente (Figura 2).

En cada terrario se colocaron hembras y machos con una alimentación semanal de 150 g de MF fresca de bovinos sin tratamiento con antihelmínticos en 6 semanas. Previo a la introducción de hembras se midieron en mm el largo del pronoto más el élitro y el ancho máximo del pronoto. Cada terrario fue revisado semanalmente, hasta la muerte de los adultos, contabilizando el número de MN, acondicionándolas posteriormente en terrarios plásticos en iguales condiciones a las descritas anteriormente hasta la emergencia de los adultos de la F2 (segunda generación nacida en laboratorio), registrando los datos de largo, ancho y peso.

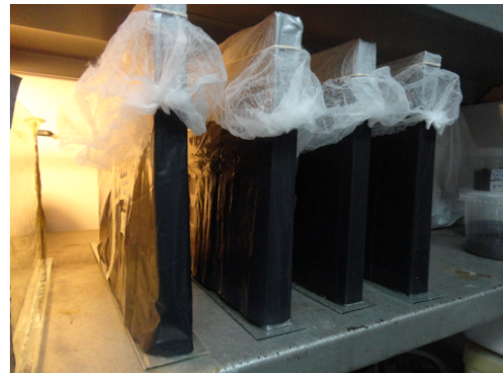


Figura 3. A. Terrario de vidrio con mezcla de arena:vermiculita y alimento, para parejas de adultos de *Onthophagus hircus* sin la pared móvil. **B.** Terrarios de vidrio acondicionados en insectario.

Se realizaron 4 terrarios con individuos adultos para cada generación (F0 y F1).

Indicadores de desempeño reproductivo

Tamaño corporal de las hembras

Se comparó el tamaño corporal de las hembras recolectadas en el campo (F0) con el tamaño corporal de las hembras nacidas en el laboratorio (F1). Mediante el largo del pronoto más el élitro y el ancho máximo del pronoto se determinó el volumen corporal (mm^3) de cada hembra (Ecuación 1).

$$\text{volumen corporal} = \pi * (\text{ancho (mm)} / 2)^2 * \text{largo (mm)}$$

Ecuación 1. Volumen corporal (mm^3) calculado usando la fórmula de volumen de un cilindro: $V = \pi r^2 h$, donde $(\text{ancho} / 2)^2$ es el radio al cuadrado y el largo es la altura.

Dimensiones de las masas-nido

Se compararon las dimensiones de las MN generadas por los adultos recolectados en campo con las MN elaboradas por los adultos nacidos en el laboratorio. Dichas comparaciones se realizaron utilizando el peso (g) y volumen (cm^3) de cada MN, el cual fue determinado mediante el largo (mm) y el ancho (mm) (Ecuación 2).

$$volumenMN = \pi * (ancho (cm)/2)^2 * largo(cm)$$

Ecuación 2. Volumen de las masas-nido (cm³) calculado usando la fórmula de volumen de un cilindro (ver Ecuación 1).

Fecundidad de las hembras

La fecundidad de las hembras fue estimada como el cociente entre la cantidad de MN colectadas sobre la cantidad de hembras colocadas en los terrarios (*fec1*) y como el cociente entre la cantidad de MN colectadas sobre la cantidad de hembras colocadas en los terrarios, en función de la relación hembras-machos (proporción sexual) de dichos terrarios (*fec2*) (Ecuación 3 y 4).

$$fec1 = \frac{totaldemasas-nido}{totaldehembras}$$

Ecuación 3. Fecundidad ***fec1***: fecundidad de las hembras por terrario (MN/h).

$$fec2 = \frac{\frac{totaldemasas-nido}{totaldehembras}}{relaciónhembras/machos}$$

Ecuación 4. Fecundidad ***fec2***: fecundidad de las hembras en función de la relación hembras-machos (proporción sexual) para cada terrario [(MN/h)/(h/m)].

Tasa de emergencia

La tasa de emergencia (sobrevivencia de los imagos) fue calculada como el porcentaje de la relación de los imagos emergidos por el total de MN registradas (Ecuación 5)

$$t = \frac{totaldeimagoemergidos}{totaldemasas-nidoregistradas} * 100$$

Ecuación 5. Tasa de emergencia (%) calculada como el cociente entre el total de los imagos emergidos y el total de las masas-nido registradas para cada terrario.

Tiempo de desarrollo post embrionario

Se estimó el tiempo de desarrollo post embrionario para cada grupo, como el tiempo entre la puesta del huevo (colecta de la MN) y la emergencia del imago.

Tamaño corporal de la progenie

El tamaño corporal de la progenie de cada grupo, imagos F1 (progenitores recolectados en campo) e imagos F2 (progenitores nacidos en el laboratorio) se comparó utilizando el volumen corporal (mm^3) de los individuos (Ecuación 1).

Análisis estadístico

Los datos cuantitativos obtenidos fueron analizados de acuerdo a técnicas estadísticas descriptivas y estudios de distribución. En base a estos resultados, se aplicó un modelo lineal mixto generalizado, considerando como efecto fijo el grupo y como efecto aleatorio el terrario anidado al grupo (definido como la unidad experimental), las diferencias estadísticas significativas fueron evaluadas con un nivel de confianza del 95 % ($p\text{-valor} < 0,05$, estimado mediante bootstrap paramétrico [$n = 1000$]). A las variables fecundidad y tasa de emergencia, se les aplicó un modelo lineal generalizado con el mismo nivel de confianza y significación. Para determinar el tiempo de desarrollo postembrionario se utilizó el estimador de Kaplan-Meier (Peterson Jr 1977), el test de igualdad entre grupos asociado al estimador fue mediante Chi cuadrado con test de Wilcoxon. Para visualizar el comportamiento de los indicadores para los distintos grupos se usaron gráficos de dispersión y curvas de “supervivencia”. Se analizó de manera conjunta la distribución de densidad y las medidas de posición de los percentiles; comparando las medidas de resumen con las frecuencias y la topografía de la función de densidad (Hintze y Nelson, 1998).

Para el análisis de los datos y las representaciones gráficas se utilizó el software R (versión 4.0.2, R Development Core Team 2018). Los análisis cuantitativos se realizaron mediante funciones del paquete {base} y el paquete {lme4} (Bates *et al.* 2015). La manipulación de los datos y las representaciones gráficas se realizaron utilizando el entorno {tidyverse} (Wickham *et al.* 2019) y el paquete {visR} (Saldana *et al.* 2021).

Resultados

La reproducción en laboratorio entre individuos recolectados en campo e imagos nacidos en laboratorio se comparó mediante los indicadores de desempeño reproductivo de la especie objetivo.

Tamaño corporal de las hembras

El tamaño de las hembras se determinó para establecer la existencia de diferencias en las MN. Dicho indicador presentó un rango de variabilidad desde 28,38 mm³ a 68,99 mm³. El promedio de cada grupo, F0 y F1 fue de $46,04 \pm 9,49$ mm³ (Coeficiente de variación: CV 21 %, n = 33) y $42,08 \pm 6,71$ mm³ (CV 16 %, n = 14), respectivamente (Figura 3). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos mediante ajuste de modelo lineal mixto (p-valor estimado = 0,17).

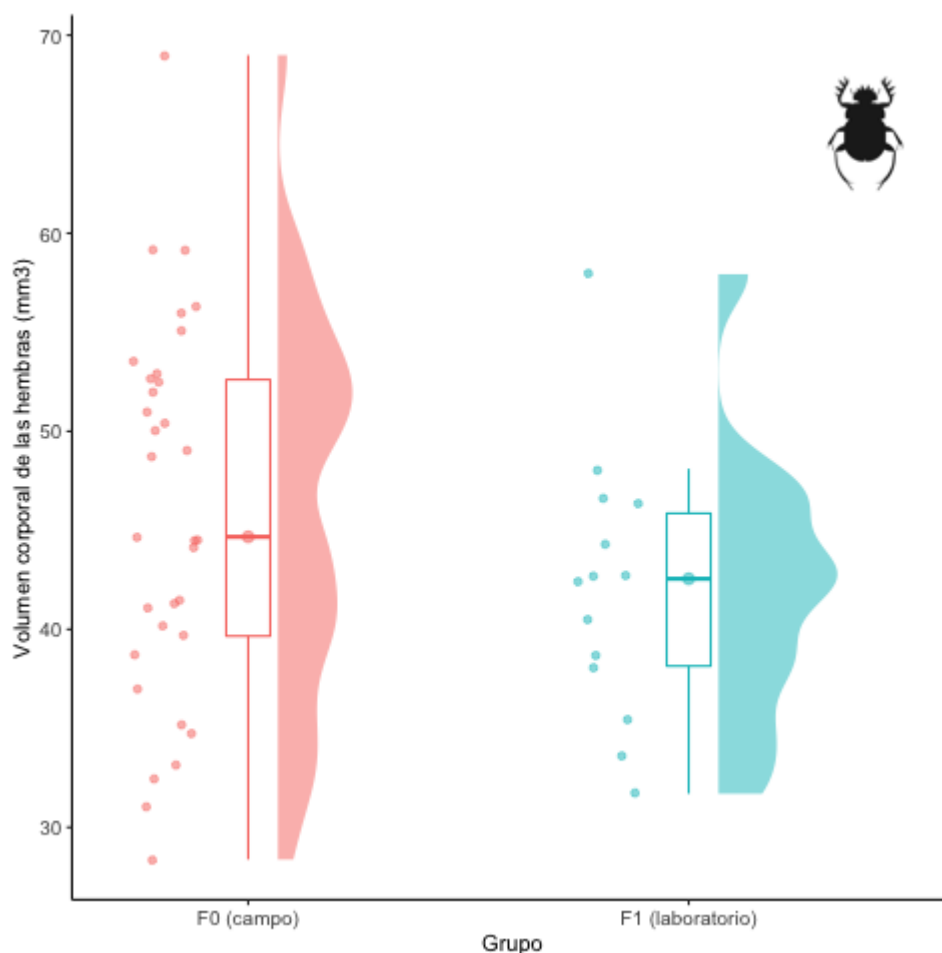


Figura 4. Gráfico de dispersión para el tamaño corporal de las hembras de *Onthophagus hircus* por grupo experimental, F0 y F1. Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Dimensiones de las masas-nido

El tamaño de las MN sirve para determinar la existencia de diferencias en el tamaño de la progenie. En relación a las dimensiones de las MN, los valores promedios de largo y ancho para cada grupo, MN-F0 (MN de F0) y MN-F1 (MN de F1) fueron $20,12 \pm 3,34$ mm (CV 17 %) y $11,17 \pm 1,25$ mm (CV 11 %, n = 61), y $21,76 \pm 2,91$ mm (CV 13 %) y $10,95 \pm 1,30$ mm (CV 12 %, n = 131), respectivamente. El volumen presentó un rango de variabilidad desde $1,11 \text{ cm}^3$ a $4,43 \text{ cm}^3$, el rango de variabilidad del peso fue de 0,64 gr a 2,49 gr. Los valores promedios de volumen y peso para cada grupo fueron $2,03 \pm 0,69 \text{ cm}^3$ (CV 34 %) y $1,27 \pm 0,38$ gr (CV 30 %), y $2,06 \pm 0,63 \text{ cm}^3$ (CV 30 %) y $1,45 \pm 0,33$ gr (CV 23 %), MN-F0 y MN-F1 respectivamente (Figura 4 A y B). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos MN-F0 y MN-F1 para cada una de las dimensiones mencionadas determinado por ajuste de modelo lineal mixto (p-valor estimado para volumen = 0,46; p-valor estimado para peso = 0,53). Se observó una relación positiva entre las variables peso y volumen de las MN (Pearson $r = 0,74$; p-valor $< 2,2e^{-16}$) (Figura 4 C).

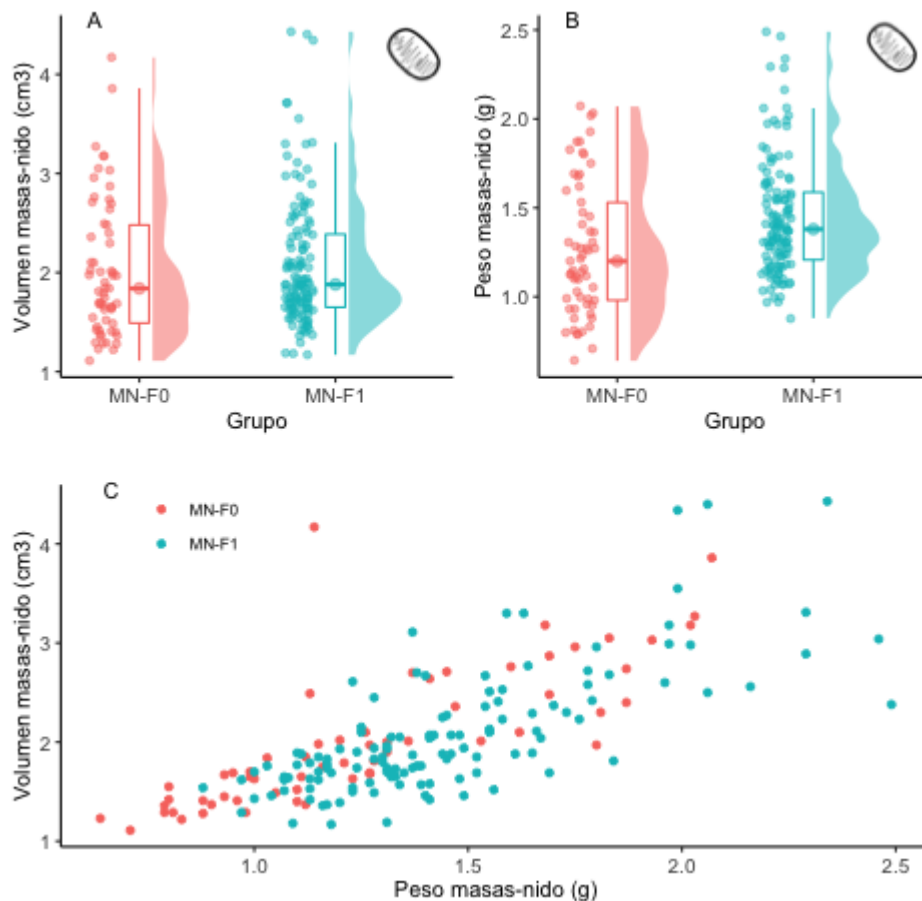


Figura 5. Gráficos de dispersión para: **A.** Volumen (cm^3) de las masas-nido de F0 (MN-F0, progenitores recolectados en campo) y masas-nido de F1 (MN-F1, progenitores nacidos en el laboratorio); **B.** Peso (gr) de las masas-nido de cada grupo, MN-F0 y MN-F1; **C.** Gráfico de correlación entre peso (g) y volumen (cm^3) de las masas-nido para cada grupo, MN-F0 y MN-F1. Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Fecundidad de las hembras

La fecundidad de las hembras del grupo F0 (adultos recolectados en campo) no fue considerada para su cálculo puesto que no se dispone de información relativa a la longevidad o estado reproductivo de las mismas al momento de la recolección. Respecto al grupo F1, la cantidad de hembras y rango de variabilidad se observa en la Tabla 1. Los valores promedios fueron, para fec1 $9,33 \pm 2,26$ MN/h (CV 24 %) y para fec2 $6,96 \pm 2,91$ (MN/h)/(h/m) (CV 42 %). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la fecundidad tanto para fec1 como para fec2 entre los terrarios, determinado por modelo lineal generalizado (p-valor > 0,05).

Tabla 1. Fecundidad para los terrarios de F1 respecto a las hembras (fec1) y en función de la proporción sexual (fec2).

Grupo/Terrario	Hembras (n)	Machos (n)	Relación h/m	Total MN (n)	fec1	fec2
F1/1	3	3	1	31	10.3	10.3
F1/2	3	3	1	24	8.0	8.0
F1/3	4	2	2	28	7.0	3.5
F1/4	4	2	2	48	12.0	6.0

fec1: fecundidad de las hembras para cada terrario (MN/h).

fec2: fecundidad de las hembras en función de la relación sexual para cada terrario [(MN/h)/(h/m)].

Tasa de emergencia

La cantidad de MN recolectadas por terrario por grupo y el rango de variabilidad de la tasa de emergencia arrojaron valores promedios para F1 de $43,14 \pm 35,40$ (imagoes/total de MN-F0) (CV 82 %) y para F2: $41,97 \pm 12,41$ (imagoes/total de MN-F1) (CV 30 %). Si bien las tasas medias para los grupos tienen valores cercanos, sus medidas de dispersión y sus rangos de variabilidad presentaron diferencias en la tasa por terrario por grupo (Tabla 2). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de emergencia entre los imagoes de F1 y F2, determinado por modelo lineal (p-valor = 0,95).

Tabla 2. Cantidad de masas-nido y Tasa de emergencia por terrario de cada grupo experimental, F1 y F2.

Grupo/Terrario	MN (n)	Tasa (%)
F1/1	35	85.7
F1/2	2	50.0
F1/3	19	36.8
F1/4	5	0.0
F2/1	31	58.1
F2/2	24	37.5
F2/3	28	28.6
F2/4	48	43.8

Tiempo de desarrollo post embrionario

El tiempo de desarrollo post embrionario permitió comparar las condiciones de cría, mantenimiento y acondicionamiento de las MN y la emergencia de los individuos de los grupos experimentales. El tiempo de emergencia del grupo F2 fue aproximadamente un tercio menor que el de F1 (Figura 5, Tabla 3). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (Wilcoxon: Chi cuadrado = 23,73, df = 1, p-valor < 0,001).

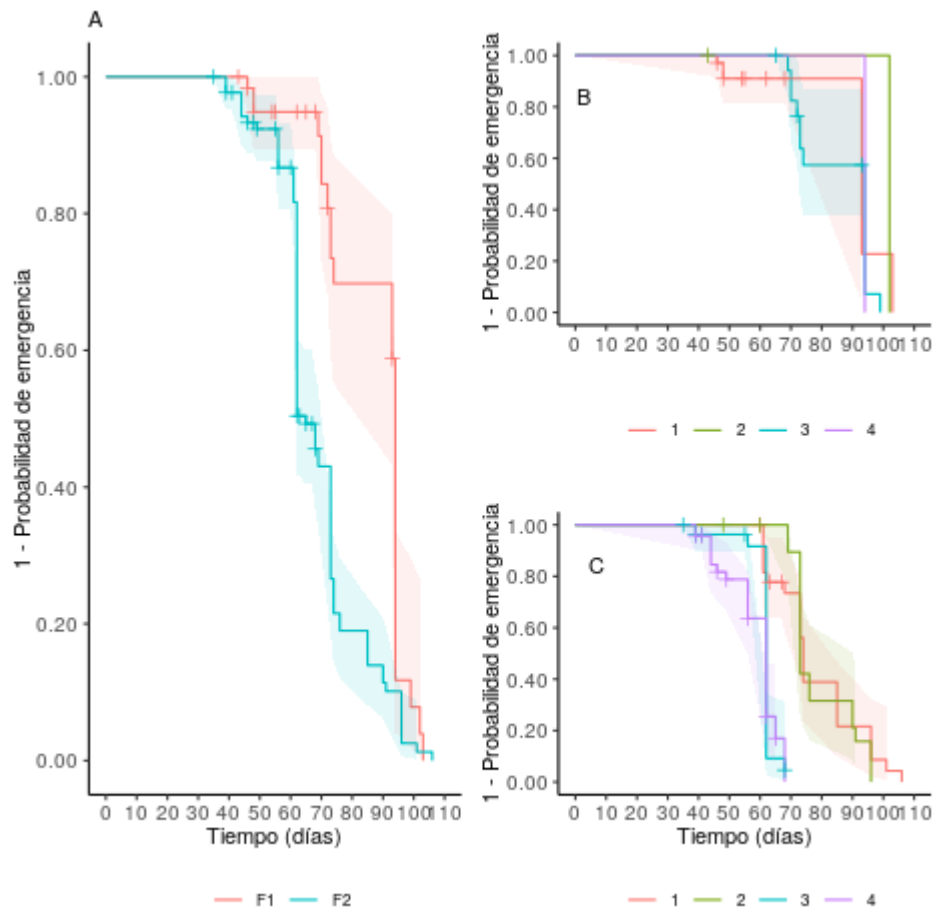


Figura 6. A. Gráfico inverso del tiempo de emergencia de los imagos de cada grupo experimental, F1 y F2. **B.** Gráfico inverso del tiempo de emergencia de los imagos por terrario del grupo F1. **C.** Gráfico inverso del tiempo emergencia de los imagos por terrario del grupo F2. La línea representa la probabilidad de emergencia a cada tiempo determinado y la sombra el IC₉₅ (intervalo de confianza del 95 %).

Tabla 3. Tiempo medio de emergencia por grupo experimental, F1 y F2, e intervalo de confianza del 95 % (IC₉₅).

Grupo	Tiempo medio (días)	IC 95% (días)
F1	94	93-94
F2	65	62-73

Tamaño corporal de la progenie

El tamaño corporal de la progenie presentó una variabilidad desde 15,79 mm³ a 57,98 mm³, el tamaño promedio para los grupos F1 y F2 fue $33,18 \pm 7,72$ mm³ (CV 23 %, n = 33) y $37,49 \pm 9,82$ mm³ (CV 26 %, n = 20) respectivamente (Figura 6). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, determinado por ajuste de modelo lineal mixto (p-valor estimado = 0,61).

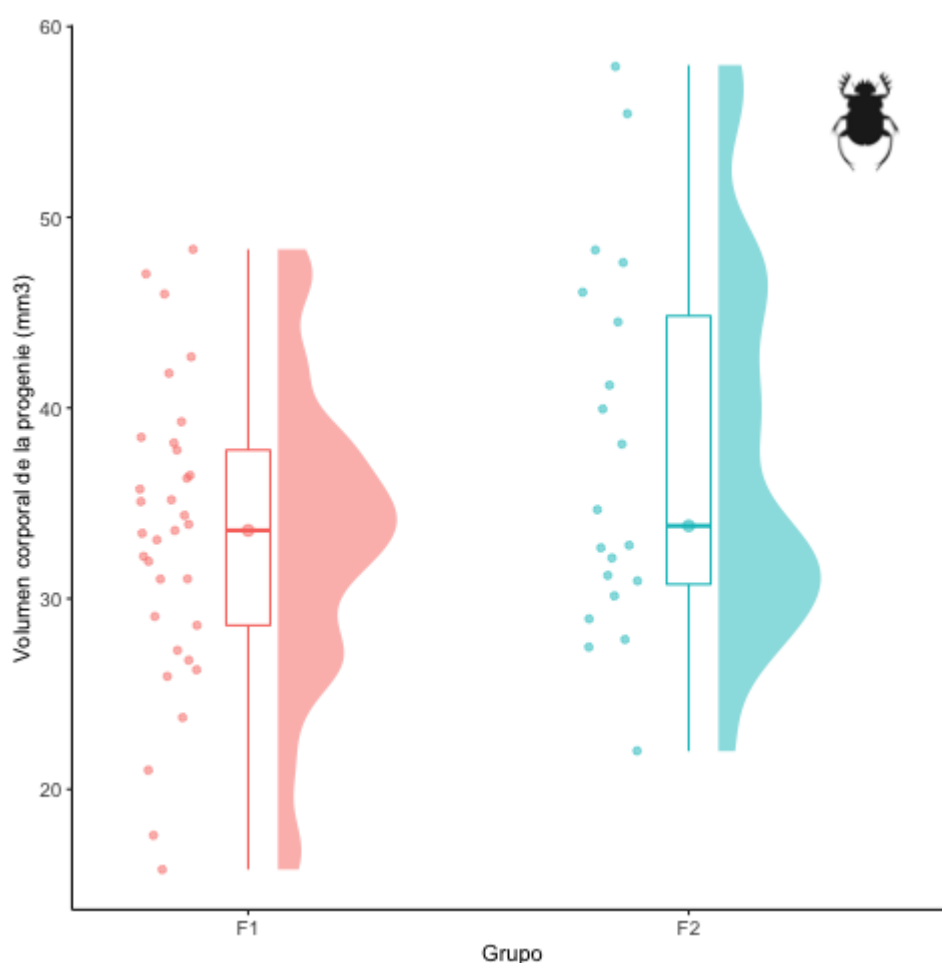


Figura 7. Gráfico de dispersión para el tamaño corporal de la progenie de *Onthophagus hircus* por grupo experimental, F1 y F2. Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Principales aportes

Dado los resultados obtenidos, bajo las condiciones de luz, temperatura y alimento que se realizaron, la cría en laboratorio de la especie *O. hircus* no afectó los principales parámetros de su desempeño reproductivo como ser el tamaño de las MN, la fecundidad de las hembras y tamaño de la progenie, pese a la variabilidad de los resultados.

El único indicador que presentó diferencias estadísticamente significativas es el tiempo de desarrollo postembrionario, siendo el tiempo del grupo F2 menor en relación al del grupo F1.

Bajo la obtención de estos resultados, donde los principales indicadores de desempeño reproductivo no presentan diferencias estadísticamente significativas entre grupos, es posible la cría en laboratorio del coleóptero coprófago *O. hircus* bajo condiciones óptimas y controladas que permitan disponer de una generación apta para la realización de ensayos de ecotoxicidad.

CAPÍTULO II - Primera aproximación al efecto de Eprinomectina en materia fecal bovina sobre el desempeño reproductivo de *Onthophagus hircus*

Introducción

Eprinomectina

Las LM (avermectinas y milbemicinas) se caracterizan por ser fármacos endectocidas, ya que se utilizan para el control de ectoparásitos y endoparásitos de importancia clínica en medicina veterinaria. Sin embargo, pueden tener un impacto negativo con riesgos ambientales, según pautas de evaluación internacionales tanto en aguas superficiales como sedimentos y estiércol (Liebig *et al.* 2010).

Dentro de las avermectinas, se encuentra la EPM, desarrollada para una administración tópica *pour-on*. La absorción en bovinos es inmediata y se mantiene hasta 10 días posteriores a la administración. Su metabolización es mínima y la eliminación es mayoritariamente por heces en forma activa, no requiriendo tiempo de retiro en vacas lecheras (Dupuy *et al.* 2001). Menos del 1 % se elimina mediante la orina (Sumano & Ocampo 2006).

La presentación comercial de EPM para ganado bovino es tópica *pour-on* y la dosis es de 0,5 mg/kg de peso vivo (Sumano & Ocampo 2006; Lifschitz *et al.* 2002). La concentración fecal promedio obtenida una vez administrada dicha dosis varía en un rango de 164 ± 115 ng/g de materia seca desde el primer día de su administración, a 4 ± 5 ng/g de materia seca a los 29 días post tratamiento; con una concentración máxima de 350 ± 220 ng/g de materia seca el día 3 (Lumaret *et al.* 2005). A su vez, tiene una semivida variable en mezclas de MF y suelo desde 14 días en meses de verano a 240 días a 22 °C en condiciones de laboratorio (Lifschitz *et al.* 2002).

A nivel mundial se han realizado estudios del efecto de EPM en algunas especies de coleópteros coprófagos. En 1996 se determinó su toxicidad sobre las especies *Digitonthophagus gazella* y *Euoniticellus intermedius*. Dentro del rango de las concentraciones evaluadas (7 - 590 ng/g), no se presentaron efectos negativos sobre los adultos, mientras que la progenie de dichas especies no emergió en concentraciones de 166 y 590 ng/g. La máxima concentración sin efectos observables en las dos especies fue de 64,7 ng/g (Merk & Company, 1996). Estas concentraciones se encuentran dentro del

rango de concentraciones de eliminación en MF posterior al tratamiento tópico con EPM (Lumaret *et al.* 2005). Por otra parte, se observó una alta mortalidad de estadios inmaduros de *D. gazella* alimentados con heces excretadas de 1-2 semanas post tratamiento. Además se registró un aumento de la mortalidad de adultos recién emergidos alimentados con MF de 3 días post tratamiento, con la subsiguiente inhibición de su fecundidad (Wardhaugh *et al.* 2001).

Si bien a nivel mundial se han realizado estudios del efecto de toxicidad de EPM sobre las especies coprófagas, en la región existe escasa información sobre el efecto que el uso de EPM pueda generar en el ambiente y en la comunidad coprófaga local.

Objetivo específico

Determinar el efecto de materia fecal bovina fortificada con Eprinomectina sobre los indicadores de desempeño reproductivo y tiempo de sobrevivencia del coleóptero coprófago *Onthophagus hircus*.

Materiales y métodos

Preparación de las soluciones de trabajo

Se colectó y congeló MF fresca de bovinos pastoreando a campo natural libres de tratamientos con antihelmínticos en las últimas 6 semanas. Para la preparación del alimento previo a su administración, se preparó una solución madre metanólica de EPM (0,15 %, Lote 06091908, Compañía Cibeles, Uruguay). Para fortificar la MF se prepararon soluciones de trabajo de EPM a partir de la solución madre disuelta en Acetona (1:10). En la cantidad necesaria de MF, se colocó 1 mL de solución de trabajo para obtener las concentraciones evaluadas de EPM (0,05; 0,5; 5; 50 ppm). Una vez embebida la solución, fue homogenizada mediante espátula para asegurar una correcta dispersión de la solución de trabajo en toda la MF. Luego se dejó reposar durante 30 minutos para lograr la volatilización del solvente (Cruz Rosales *et al.* 2012).

Individuos y acondicionamiento

Se utilizaron imagos nacidos en condiciones de laboratorio, de los cuales se posee información y trazabilidad desde el estado de huevo. El acondicionamiento, registro de medidas, seguimiento y control de los individuos y sus MN, se realizó siguiendo las pautas detalladas en el Capítulo I.

Grupo control (GC)

Hembras y machos fueron acondicionados en terrarios de vidrio, con alimentación semanal de 150 g de MF fresca libre de antihelmínticos en las últimas 6 semanas, en las condiciones de temperatura y luz descritas. Previo a la introducción de las hembras en los terrarios, se registraron largo y ancho corporal. Cada terrario fue revisado semanalmente hasta la muerte de los adultos, contabilizando la puesta de las MN y acondicionándolas en terrarios plásticos en iguales condiciones de laboratorio hasta la emergencia de los adultos. Previo a su acondicionamiento se tomaron las medidas de largo, ancho y peso. El seguimiento y control se realizó bajo las condiciones ya detalladas.

Se realizaron 4 terrarios con grupos control.

Grupo Tratamiento (GT)

Parejas de imagos fueron acondicionados en iguales condiciones a las descritas. Al GT semanalmente se le proporcionó 150 g de MF con EPM (0,05 ppm [50 ng/g]) previamente fortificada en el laboratorio.

Se realizaron 4 terrarios de grupos tratados. De la misma manera que con el núcleo inicial, los terrarios fueron revisados semanalmente durante 1 mes. En cada revisión se colectaron las MN generadas, que fueron acondicionadas en terrarios plásticos para su posterior revisión. Previo al acondicionamiento de cada ejemplar se registró largo, ancho y peso. A partir de los 30 días de la colecta y hasta 120 días posteriores, se realizó un control semanal hasta la emergencia del imago. Luego de los 120 días, fueron abiertas para corroborar si eran MN o masas de alimentación.

Indicadores de desempeño reproductivo

Los indicadores del desempeño reproductivo fueron: tamaño corporal de las hembras, dimensiones de las MN, fecundidad de las hembras, tasa de emergencia, tiempo de

desarrollo post embrionario y tamaño corporal de la progenie, comparándose los grupos tratados con los controles.

Tiempo medio de sobrevida

Bajo la mismas condiciones descritas en el Capítulo I, se recolectaron individuos adultos en campo con la finalidad de hallar el tiempo medio de sobrevida para EPM en MF para los adultos de *O. hircus*. Los grupos control y tratado, consistieron en el control: se administró MF fresca con diluyente (acetona) y sin ningún antihelmíntico. A los grupos tratados se les administró MF fresca con concentración de EPM de 0,05 ppm, 0,5 ppm, 5 ppm y 50 ppm, respectivamente.

Se asignaron 24 individuos adultos (15 hembras y 9 machos) a cada grupo en terrarios plásticos de 10 cm de diámetro y 10 cm de altura acondicionados con una mezcla compactada de arena:vermiculita (2:1) de unos 5 cm de profundidad. Durante una semana, al día 0, 3 y 5, se alimentaron con 50 g de MF fresca de bovinos homogeneizada con la concentración correspondiente para cada grupo.

Para determinar el tiempo medio de sobrevida, previo al cambio de alimentación de cada grupo (día 3, 5, $n = 24$), se contabilizaron los individuos adultos vivos y muertos de cada grupo. Una vez culminado el período, se realizó el recuento final.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados de acuerdo a técnicas estadísticas descriptivas y estudios de distribución. De acuerdo a estos análisis, se aplicó un modelo lineal mixto generalizado, considerando como efecto fijo el grupo y como efecto aleatorio, el terrario anidado al grupo (definido como unidad experimental). Las diferencias estadísticas significativas fueron evaluadas con un nivel de confianza del 95 % ($p\text{-valor} < 0,05$). A las variables fecundidad y tasa de emergencia se les aplicó un modelo lineal generalizado con el mismo nivel de confianza y significación. Para determinar el tiempo de desarrollo post embrionario y el tiempo medio de sobrevida se utilizó el estimador de Kaplan-Meier (Peterson Jr 1977). El test de igualdad entre grupos asociado al estimador fue Chi cuadrado con Wilcoxon. Para visualizar el comportamiento de los indicadores para los distintos grupos se usaron gráficos de dispersión y curvas de “supervivencia”. De esta forma se puede observar de manera conjunta la distribución de densidad y las medidas de posición de los percentiles;

comparando las medidas de resumen con las frecuencias y la topografía de la función de densidad (Hintze y Nelson, 1998).

Se utilizó el software R (versión 4.0.2, R Development Core Team 2018). Los análisis cuantitativos se realizaron con funciones base que dispone el software y utilizando el paquete {lme4} (Bates *et al.* 2015). La manipulación de los datos y las representaciones gráficas se realizaron utilizando el entorno {tidyverse} (Wickham *et al.* 2019) y el paquete {visR} (Saldana *et al.* 2021).

Resultados

Tamaño corporal de las hembras

El tamaño corporal de las hembras presentó un rango de 24,64 mm³ a 57,93 mm³. El valor promedio de tamaño corporal de cada grupo, GC y GT, fue de 42,08 ± 6,71 mm³ (CV 16 %, n = 14) y 40,57 ± 10,42 mm³ (CV 26 %, n = 16), respectivamente (Figura 7). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, GC y GT, determinado por ajuste de modelo lineal mixto (p-valor estimado = 0,49).

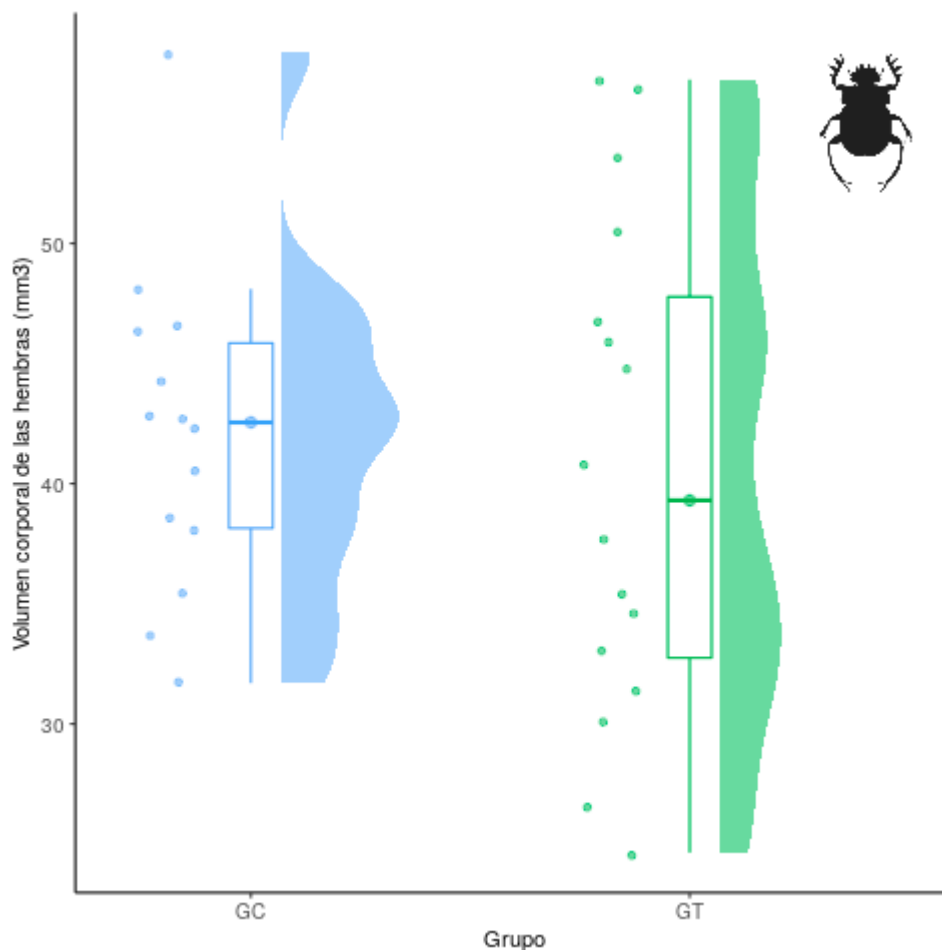


Figura 8. Gráfico de dispersión para el tamaño corporal de las hembras de *Onthophagus hircus* por grupo experimental, grupo control (GC) y grupo tratamiento (GT). Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Dimensiones de las masas-nido

En relación a las dimensiones de las MN, los valores promedios de largo y ancho para cada grupo, GC y GT, fueron $21,76 \pm 2,91$ mm (CV 13 %) y $10,95 \pm 1,30$ mm (CV 12 %, n = 131), y $21,46 \pm 2,98$ mm (CV 14 %) y $11,43 \pm 1,69$ mm (CV 15 %, n = 198), respectivamente. El volumen presentó un rango de $0,95 \text{ cm}^3$ a $7,11 \text{ cm}^3$ y el rango de peso fue de 0,86 gr a 2,87 gr. Los valores promedios de volumen y peso para cada grupo fueron de $2,10 \pm 0,77 \text{ cm}^3$ (CV 37 %) y $1,45 \pm 0,34$ gr (CV 23 %), y $2,25 \pm 0,79 \text{ cm}^3$ (CV 35 %) y $1,60 \pm 0,39$ gr (CV 24 %), respectivamente (Figura 8 A y B). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada una de las dimensiones mencionadas, determinado por un ajuste de modelo lineal mixto (p-valor estimado para volumen = 0,57,

p-valor estimado para peso = 0,92) (Figura 8 C). Se observó una relación positiva entre las variables peso y volumen de las MN (Pearson $r = 0,70$; p-valor < $2,2e-16$).

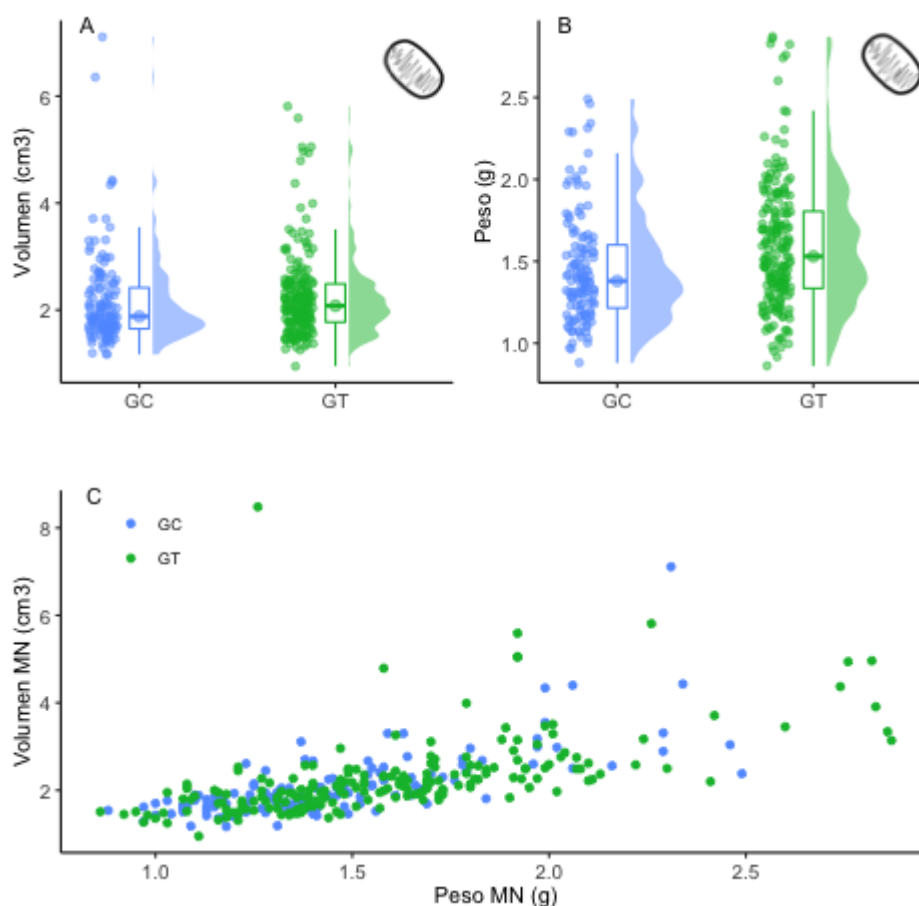


Figura 9. Gráfico de dispersión para: **A.** Volumen (cm³) de las masas-nido del grupo control (GC) y masas-nido del grupo tratamiento (GT) y **B.** Peso (gr) de las masas-nido de cada grupo, GC y GT; **C.** Gráfico de correlación entre el peso (g) y el volumen (cm³) de las masas-nido para cada grupo, GC y GT. Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Fecundidad de las hembras

La cantidad de hembras y el rango de variabilidad para fec1 y fec2 de cada grupo, GC y GT, se observa en la Tabla 4. Los valores promedios del GC fueron, para fec1 $9,33 \pm 2,26$ MN/h (CV 24 %) y para fec2 $6,96 \pm 2,91$ (MN/h)/(h/m) (CV 42 %). Mientras que para el GT sus valores promedios fueron, para fec1 $12,44 \pm 2,00$ MN/h (CV 16 %) y para fec2 $6,59 \pm 2,03$ (MN/h)/(h/m) (CV 31 %). Si bien las fecundidades medias y sus medidas de dispersión

y posición para los grupos presentaron valores similares, la fecundidad por grupo por terrario presentó rangos más dispares (duplicó el CV) (Tabla 4). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la fecundidad tanto para fec1 (respecto a las hembras) como para fec2 (respecto a la relación sexual) para los grupos GC y GT, determinado por modelo lineal generalizado (p-valor fec1 = 0,19; p-valor fec2 = 0,84).

Tabla 4. Fecundidad por terrario para cada grupo experimental, grupo control (GC) y grupo tratamiento (GT), respecto a las hembras (fec1) y en función de la proporción sexual (fec2).

Grupo/Terrario	Hembras (n)	Machos (n)	Relación h/m	Total MN (n)	fec1	fec2
GC/1	3	3	1.0	31	10.3	10.3
GC/2	3	3	1.0	24	8.0	8.0
GC/3	4	2	2.0	28	7.0	3.5
GC/4	4	2	2.0	48	12.0	6.0
GT/1	5	2	2.5	73	14.6	5.8
GT/2	5	2	2.5	54	10.8	4.3
GT/3	3	2	1.5	32	10.7	7.1
GT/4	3	2	1.5	41	13.7	9.1

fec1: fecundidad de las hembras para cada terrario (MN/h).

fec2: fecundidad de las hembras en función de la relación sexual para cada terrario [(MN/h)/(h/m)].

Tasa de emergencia

El GT, no presentó emergencia de imagos (tasa de emergencia cero). El GC, presentó un rango de emergencia de 28,6 a 58,1 (imagos/total de MN-GC). El valor promedio fue de $41,97 \pm 12,40$ (imagos/total de MN-GC) (CV 30 %). (Tabla 5).

Tabla 5. Cantidad de masas-nido y tasa de emergencia por terrario para cada grupo experimental, grupo control (GC) y grupo tratamiento (GT).

Grupo/Terrario	MN (n)	Tasa (%)
GC/1	31	58.1
GC/2	24	37.5
GC/3	28	28.6
GC/4	48	43.8
GT/1	73	0.0
GT/2	54	0.0
GT/3	32	0.0
GT/4	41	0.0

Tiempo de desarrollo post embrionario

El tiempo medio de desarrollo post embrionario para el GC fue de 65 días, con un intervalo de confianza (IC 95%) de 62-73 días. El GT no presentó emergencia de los imagos (Figura 9).

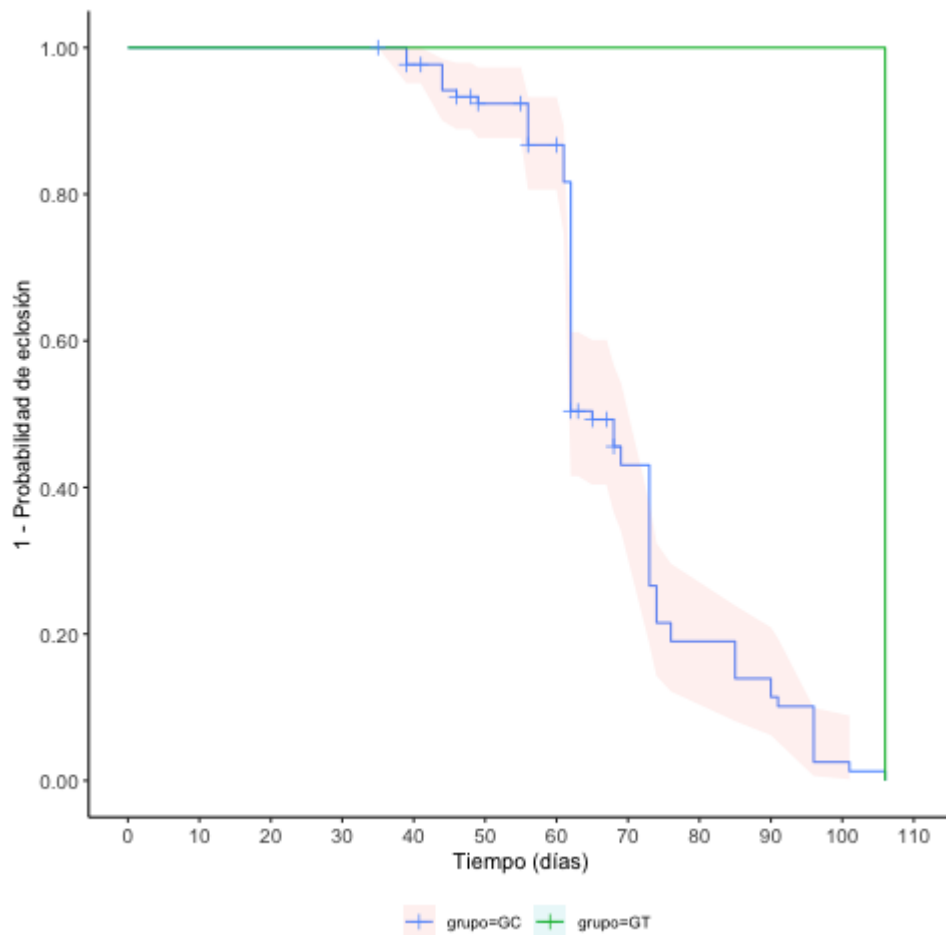


Figura 10. Gráfico inverso del tiempo de emergencia de los imágos para cada grupo experimental, grupo control (GC) y grupo tratamiento (GT). La línea representa la probabilidad de emergencia a cada tiempo determinado y la sombra el IC₉₅ de la misma.

Tamaño corporal de la progenie

El tamaño corporal de la progenie del GC presentó un rango de variabilidad desde 22,00 mm³ a 57,98 mm³, el valor promedio para dicho grupo fue de 37,49 ± 9,82 mm³ (CV 26 %, n = 20) (Figura 8).

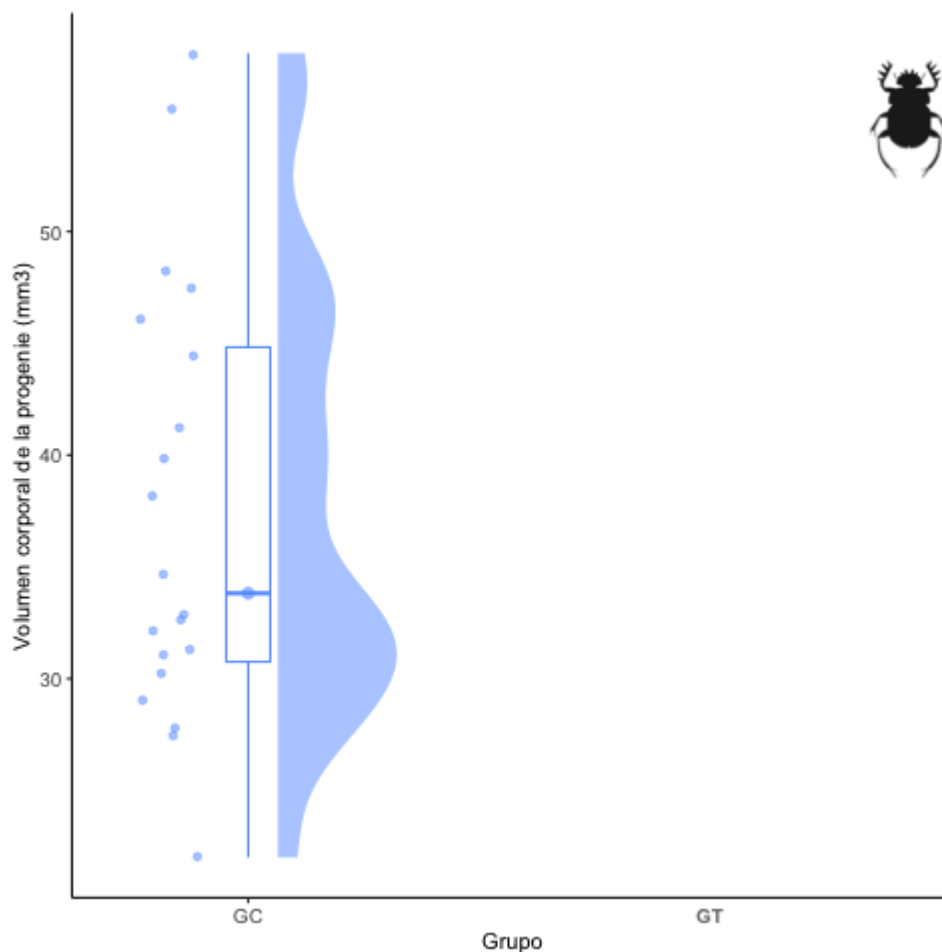


Figura 11. Gráfico de dispersión para del tamaño corporal de la progenie de *Onthophagus hircus* por grupo experimental, grupo control (GC) y grupo tratamiento (GT). Los valores se representan como puntos experimentales, gráfico boxplot y gráfico medio violín.

Tiempo medio de sobrevivida

Al finalizar el período de evaluación (día 7), el porcentaje de muertes del total de los adultos ($n = 24$) de los grupos control; 0,05; 0,5 y 5 fue inferior al 50 %, por lo cual el cálculo del tiempo medio de sobrevivida (individuos muertos / individuos vivos) no fue considerado para dichos grupos, el tiempo medio de sobrevivida para el grupo 50 fue de 7 días (Figura 11, Tabla 7). En la Figura 12 se muestra el estado de compactación del alimento para los distintos grupos experimentales luego de haber sido expuesto a los individuos por un período de 48 hs y previo a su recambio.

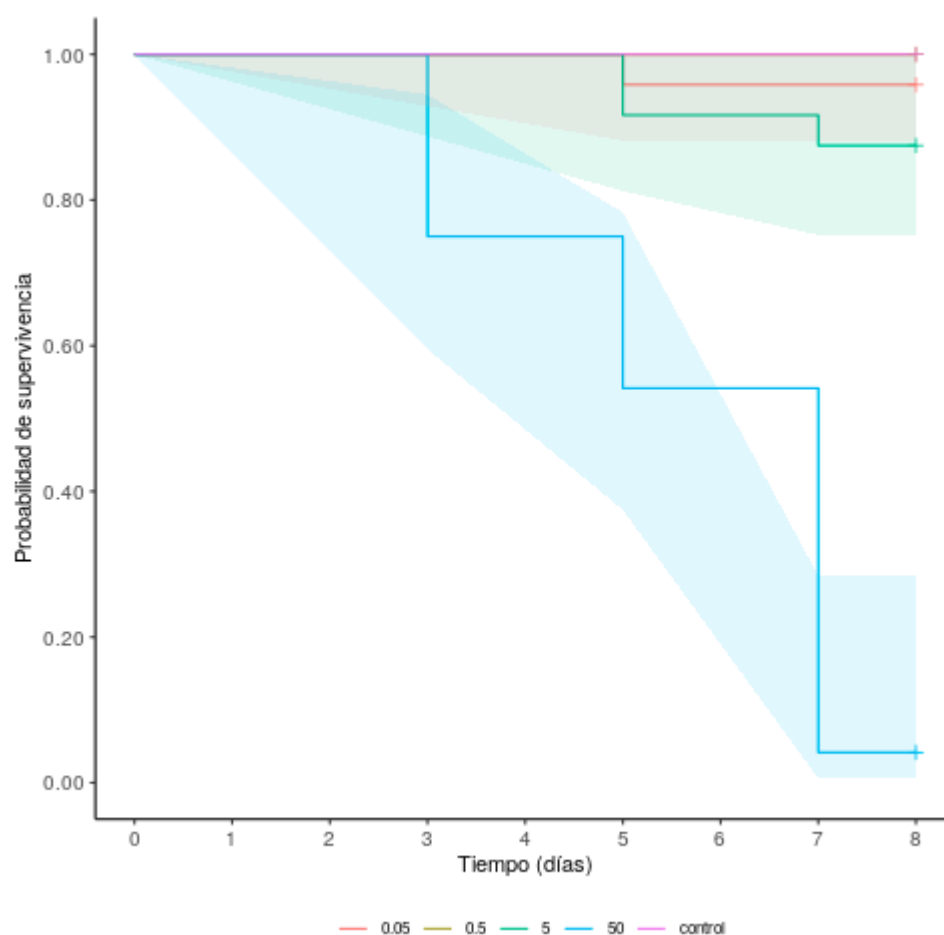


Figura 12. Curva de supervivencia para los distintos grupos experimentales (control, 0,05 ppm, 0,5 ppm y 50 ppm de Eprinomectina). La línea representa la probabilidad de emergencia a cada tiempo determinado y la sombra el IC₉₅ (intervalo de confianza del 95 %).

Tabla 6. Tiempo medio de supervivencia para Eprinomectina por grupo experimental (control, 0,05 ppm, 0,5 ppm, 5 ppm y 50 ppm de Eprinomectina) para un período de 7 días.

Concentración (ppm)	Tiempo medio (días)	IC 95% (días)	Porcentaje de muertes (%)
0	-	-	0.0
0.05	-	-	4.2
0.5	-	-	0.0
5	-	-	12.5
50	7	5-7	95.8

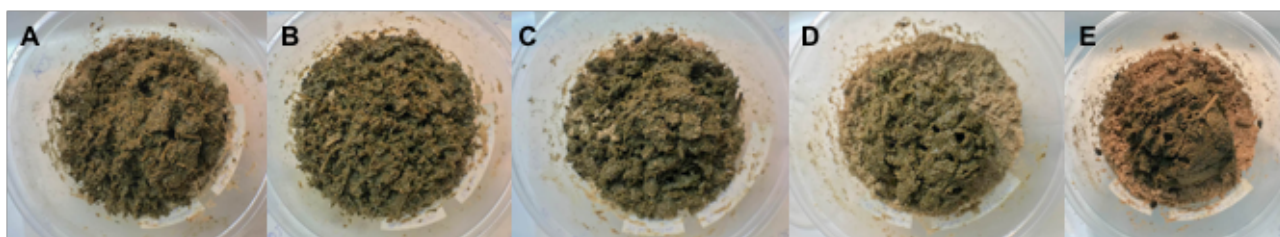


Figura 13. Estado de compactación de la materia fecal luego de 48 hs de disponibilidad como alimento a los individuos y previo al recambio del mismo para los distintos grupos experimentales, **A.** control; **B.** 0,05; **C.** 0,5; **D.** 5 y **E.** 50 ppm de Eprinomectina

Principales aportes

Tomando como base los resultados del Capítulo I, se puso a prueba el modelo de cría en laboratorio de *O. hircus* para la realización de bioensayos de ecotoxicidad a través del estudio del efecto de la presencia de concentraciones de EPM en MF sobre dichos organismos.

De los resultados obtenidos en relación al desempeño reproductivo, en el GC como en el GT, los adultos de *O. hircus* realizaron sus actividades de alimentación y reproducción, sin diferencias estadísticamente significativas entre los indicadores del desempeño reproductivo como dimensiones de las MN y fecundidad de las hembras. Sin embargo, la presencia de EPM en MF (0,05 ppm) afectó la presencia de la progenie, ya que no hubo emergencia de imagos pertenecientes a MN que fueron elaboradas con dicha MF.

Respecto al tiempo medio de sobrevivencia, se pudo observar que el grupo de adultos que fuera alimentado con una concentración de 50 ppm de EPM en MF, tuvo un efecto negativo en la supervivencia de los adultos, muriendo la mayoría después de los 7 días de recibir esa MF como alimento. Los grupos que recibieron menores concentraciones de EPM tuvieron una muerte de sus individuos menor al 13 %, remarcando al grupo que recibió como alimento MF con la concentración evaluada en el desempeño reproductivo (0,05 ppm) donde murieron el 4,2 % de sus individuos.

DISCUSIÓN

Este trabajo aporta a lograr un modelo de cría que permita disponer de una especie que posibilite el desarrollo de bioensayos de ecotoxicidad. Se seleccionó como modelo a *O. hircus* entre las aproximadamente 100 especies de coleópteros coprófagos registrados para Uruguay (Monné 1978). Entre otras razones se eligió por su pequeño tamaño, un tiempo de desarrollo post embrionario corto y los resultados obtenidos por González-Vainer & Morelli (1999) que evidencian la cría en laboratorio bajo condiciones controladas de esta especie.

Se obtuvo como resultado de este trabajo un nuevo indicador que permite comparar las dimensiones corporales de los adultos nacidos en el laboratorio y de la progenie en general (volumen corporal [mm^3]). El tamaño de los individuos no se vio afectado por las condiciones de cría. De todos modos, es necesario la realización de una cría masiva que permita disponer de un número importante de individuos que den mayor respaldo a los resultados obtenidos. Respecto al tamaño de las MN, se utilizó un nuevo indicador dimensional del tamaño (volumen [cm^3]) y no se observaron diferencias significativas en el tamaño de las MN obtenidas en el laboratorio. Esto muestra que la cría en laboratorio no afecta el comportamiento de los coleópteros, pudiendo considerar a las MN como un indicador en pruebas de ecotoxicidad.

Comparando los resultados obtenidos con el trabajo de Gonzalez-Vainer & Morelli (1999), donde criaron a la misma especie en condiciones de laboratorio (12 hs luz y 22 °C), se encontró que los tamaños promedios de largo (mm) y ancho (mm) de las MN fueron menores, 20,12 y 11,17 mm para F0 (n = 61), y 21,76 y 10,95 mm para F1 (n = 131), en comparación con los de dichos autores, 27 mm de largo y 14 mm de ancho (n = 14). Una de las posibles causas de la obtención de un menor tamaño de las MN podría estar relacionada al ancho de los terrarios utilizados en este trabajo (2,5 cm); Gonzalez-Vainer & Morelli (1999) utilizaron terrarios donde el ancho de los mismos no era una limitante. Otro factor plausible de ejercer influencia sobre el tamaño es el sedimento en el cual los escarabajos realizaron sus actividades reproductivas, puesto que se ha visto que los factores ambientales y recursos alimenticios influyen en los patrones de variación morfológica y comportamental de escarabajos del género *Onthophagus* (Moczek 1998). El sedimento estaba compuesto de arena:vermiculita (2:1), que en comparación con la tierra puede generar una menor estabilidad en la compactación del sedimento (observado en el

laboratorio), pudiendo provocar excavaciones de galerías más angostas para evitar posibles derrumbes, con la consecuente disminución del tamaño en las MN confeccionadas.

Respecto a la fecundidad de las hembras, cabe destacar que los resultados obtenidos por González-Vainer & Morelli (1999) se basaron en la actividad reproductiva de 5 hembras, mientras que en este trabajo se utilizaron 33 hembras para F0 y 14 para F1. Se observó en este estudio un incremento de la cantidad promedio de MN producidas por las hembras en comparación con los registros anteriormente mencionados, el número de MN para dichos autores fue de 50, mientras que aquí se obtuvieron 61 MN-F0 y 131 MN-F1. La fec1 (9,33 MN/h) y la fec2 (6,96 [(MN/h)/(h/m)]), fueron superiores respecto a la fecundidad obtenida por dichos autores (4,3 MN/h). Sin embargo, al determinar la fecundidad de las hembras fec1 (MN/h) respecto a la fecundidad en función de la realación sexual de cada terrario fec2 (MN/h)/(h/m), se observa que aquellos terrarios donde la relación sexual es 1:1, presentaron mayores valores de fecundidad fec2. La presencia de un mayor número de machos podría ser un estímulo en la maduración de los ovocitos, la oviposición y la construcción del nido por parte de las hembras, al igual que un mayor número de cópulas, conllevando a un incremento en la fecundidad en las hembras (Cruz & Martínez, 1998).

En referencia a la tasa de emergencia, fue menor 43,14 % (F1) y 41,97 % (F2) en comparación con el 60 % que obtuvieron González-Vainer & Morelli (1999). El tiempo de desarrollo post embrionario presentó diferencias significativas, siendo menor en el grupo cuyos progenitores nacieron en laboratorio, pero sus valores son mayores a los obtenidos por González-Vainer & Morelli (1999), 94 días (F1) y 65 días (F2), en comparación con 44 días (n = 61, 131 y 50, respectivamente). Es destacable la importancia de una revisión temporal de las MN no menor a los 100 días posterior a la colecta, para obtener una mayor cantidad de individuos que permita la realización de bioensayos.

Otro aspecto importante a destacar es que, si bien se observaron diferencias en los tiempos medios de desarrollo post embrionario entre los grupos F1 (progenitores recolectados en campo) y F2 (progenitores nacidos en laboratorio), un tercio menor para F2 (65 días), este tiempo es mayor que el registrado por González-Vainer & Morelli (1999): $44,3 \pm 7,39$ días. Una posible causa de esta diferencia puede deberse al alimento. Alimento de menor calidad causa tiempo de desarrollo más lento en la larva, para poder alcanzar el tamaño adecuado (Rohner & Moczek 2021). Ambos grupos recibieron MF fresca proveniente de bovinos sin tratamiento con antihelmínticos en las últimas 6 semanas. En ocasiones, la MF fue extraída

de forma manual del recto del animal y en otras instancias recogida del suelo inmediatamente luego de su deposición. Dicha MF fue recolectada en distintos momentos del año, pudiendo variar la calidad de alimento que haya recibido el bovino (pasto natural o materia seca). También se observó que en ambos grupos F1 y F2, la emergencia de los imagos se presenta hasta aproximadamente 3,5 meses después de la colecta de las MN. Estos resultados concuerdan con Moczek (1998), resaltando la importancia de mantener un buen control de las condiciones en las cuales se realiza la cría, puesto que influyen sobre individuos del mismo género, pudiendo potenciar cambios en el tiempo de desarrollo. Es necesario un tiempo mayor de revisión de las MN, para obtener la mayor emergencia posible de imagos.

El buen manejo de los datos aquí recabados, aporta información relevante para llevar a cabo la cría de *O. hircus*, y disponer de generaciones producidas en el laboratorio para realizar bioensayos para analizar los efectos que distintos antiparasitarios aplicados en animales de producción ganadera puedan generar sobre coprófagos.

En cuanto al uso de LM como antiparasitarios, este estudio mostró importantes efectos negativos que la aplicación puede tener sobre especies coprófagas, y el impacto potencial sobre los servicios ecosistémicos que éstos brindan. La concentración utilizada para el estudio (0,05 ppm = 50 ng/g) fue la concentración promedio presente en MF bovina luego de la administración tópica *pour-on* de la droga que varía de 164 ± 115 ng/g el día 1 de su administración, a 4 ± 5 ng/g al día 29 post tratamiento; alcanzando una concentración máxima de 350 ± 220 ng/g al día 3 de su administración (Lumaret *et al.* 2005). Dicha concentración no fue letal para los adultos de *O. hircus*, ni afectó su fisiología reproductiva, ya que no tuvo consecuencias sobre la fertilidad ni la fecundidad. Tampoco afectó el comportamiento de nidificación, ya que para el GC y GT, las hembras sin diferencias en sus tamaños corporales (volumen corporal (mm^3)), elaboraron MN con dimensiones similares (volumen (cm^3)). No se encontraron diferencias entre la fecundidad de los grupos, al determinar la fecundidad de las hembras (fec1) con la fecundidad en función de la relación sexual de cada terrario (fec2). De acuerdo con los resultados de Cruz & Martínez (1998), terrarios con un mayor número de machos (relación hembra/macho de 1 para GC y 1,5 para GT), presentaron mayores valores de fecundidad fec2.

No obstante, la progenie sufrió considerables efectos que repercutieron en la proliferación de la población puesto que no hubo emergencia de los imagos. Teniendo en cuenta que

EPM e ivermectina comparten características farmacológicas, podemos considerar que resultados similares fueron obtenidos para ivermectina en otra especie de coprófago (*Euoniticellus intermedius*), donde se observaron efectos a nivel anatómico en la progenie a concentraciones de 0,01 ppm, y un efecto larvicida y efectos negativos sobre los adultos a concentraciones de 0,1 ppm (Cruz *et al.* 2011).

Existen estudios que reportan efectos a nivel fisiológico y anatómico que el uso de lactonas, en especial ivermectina sobre adultos de coleópteros coprófagos y su progenie (Cruz *et al.* 2011). Respecto a las concentraciones de eliminación de EPM en MF (164 ± 115 ng/g a 4 ± 5 ng/g) (Lumaret *et al.* 2005, Lifschitz *et al.* 2002), adultos de *O. hircus* recolectados en campo alimentados con MF fortificada a distintas concentraciones de EPM, presentaron un tiempo medio de sobrevida de 7 días a la concentración más alta utilizada de 50 ppm (0,05 mg/g). Dicha concentración se corresponde con una concentración mucho mayor a la encontrada en MF luego de su administración. Respecto de las subsiguientes concentraciones evaluadas (5; 0,5 y 0,05 ppm), presentaron un porcentaje de muerte menor al 50 %, no siendo consideradas para la determinación del tiempo medio de sobrevida. Es necesario realizar estudios que evalúen concentraciones intermedias entre 5 y 50 ppm, para analizar los tiempos medios de sobrevida. Para ello, utilizar generaciones criadas en laboratorio, permitiría tener conocimiento y trazabilidad de la longevidad, acompañando dichos estudios con estudios de dosis respuestas, pudiendo determinar la dosis letal 50 de EPM para los adultos.

La necesidad de estudios que contribuyan para determinar los efectos que el uso de LM en la región puedan tener sobre la comunidad coprófaga, es prioritaria. Resulta de gran importancia económica y ambiental estudiar el frecuente uso de estos fármacos para el control de antiparasitarios en sistemas agrícolas-ganaderos de la región y sus efectos sobre las especies coprófagas con el servicio ecosistémico que brindan (De Groot *et al.* 2002; Riviere & Papich 2009; Manning *et al.* 2016). El aumentar el área útil de pastoreo de un 5 a 10 % por hectárea es uno de estos aspectos (Bang *et al.* 2005). Los resultados obtenidos en este estudio, concuerdan con trabajos que evidencian efectos adversos de las LM sobre especies coprófagas.

Estudios fuera de la región (Canadá) sobre efectos de algunas lactonas en especies coprófagas, luego de tres años de estudio, observaron que EPM tiende a repeler a los insectos (19 de 29 especies asociadas al estiércol), contrario a lo que se vio con ivermectina

y moxidectina. También se observó un efecto repelente en especies de escarabajos estercoleros como *Onthophagus nuchicornis* y *Aphodius* spp, que prefirieron heces libres de EPM (Floate 2007). Es por ello que se destaca la relevancia de realizar estudios de este antiparasitario y otras LM en especies coprófagas con pruebas de ecotoxicidad, sus efectos sobre abundancia, riqueza y diversidad de la comunidad coprófaga en áreas agrícolas-ganaderas. Se recomienda estudios de la aplicación a fechas posteriores a la reproducción de especies coprófagas, para evaluar el efecto sobre las nuevas generaciones y la eficiencia del antiparasitario. Considerando los picos de presencia y actividad de coleópteros coprófagos entre primavera y otoño (Morelli *et al.* 2002) y sus tiempos de desarrollo post embrionario, se aconseja que el control antiparasitario en rumiantes se realice posteriormente a la época reproductiva de las especies coprófagas y evaluar el efecto sobre la progenie y la efectividad del antiparasitario. También se sugiere una disminución de estas prácticas antiparasitarias acompañando con estudios de la degradación de la MF y el control biológico de los coprófagos sobre los parásitos que se desarrollan en las heces.

CONCLUSIÓN

La puesta a punto de un modelo de cría en laboratorio de *Onthophagus hircus* permitió el desarrollo de bioensayos que evidencian el efecto de Eprinomectina en materia fecal bovina sobre esta especie coprófaga. Los resultados obtenidos resaltan la utilidad del modelo de cría en laboratorio y la necesidad de evaluaciones detalladas de los efectos de los antiparasitarios sobre la comunidad coprófaga. A pesar de que los adultos mantuvieron su actividad reproductiva al consumir alimento con concentraciones del fármaco situadas dentro del rango de eliminación, la progenie sufrió un efecto larvicida. Este trabajo constata el efecto negativo del uso de los antiparasitarios en rumiantes bovinos sobre el desempeño reproductivo de organismos coprófagos cuyo rol funcional y ecosistémico es de relevancia. La presente tesis aporta información ecológica-ambiental sobre la concientización sobre los potenciales efectos deletéreos de la utilización de antiparasitarios en la comunidad coprófaga.

COMUNICACIONES CIENTÍFICAS

Bianchinotti, V., González-Vainer, P., Suárez, G. (2020). “Primer reporte del efecto toxicológico de la Eprinomectina sobre la adecuación biológica del coleóptero coprófago *Onthophagus hirculus* (Scarabaeidae)”. X Congreso de la Red Latinoamericana de Ciencia Ambientales; Interdisciplina, ambiente y gestión: hacia la construcción de nuevos paradigmas. Centro Universitario Regional del Este, Punta del Este, Maldonado, Uruguay. (Presentación oral)

Bianchinotti, V., González-Vainer, P., Suárez, G. (2018). “Primera aproximación al impacto ecológico de la presencia de Eprinomectina sobre la cría *in-vitro* de un coleóptero coprófago: *Onthophagus hirculus* (Scarabaeidae)”. V Congreso Uruguayo de Zoología, Sociedad Zoológica del Uruguay. Facultad de Ciencias – UdelaR, Montevideo, Uruguay. (Presentación oral). <http://cuz.szu.org.uy/lib/Libro%20del%20V%20CUZ.pdf>

Bianchinotti, V., Gonzalez-Vainer, P., Suárez, G. (2017). “Puesta a punto de un modelo biológico para la cría *in-vitro* de un coleóptero coprófago (*Onthophagus hisculus*)”. X Jornadas Técnicas Veterinarias. Facultad de Veterinaria – UdelaR, Montevideo, Uruguay. (Presentación oral)

Bianchinotti, V., González, P., Robaina, D., Suárez, G. (2017). “Planteo del modelo *in-vitro* para estudiar la interacción de Lactonas Macrocíclicas y Escarabajos Estercoleros, sobre el desarrollo de la fase de vida libre de los nemátodos gastrointestinales de bovinos”. XXVI Encuentro Rioplatense de Veterinarios Endoparasitólogos, Mercedes, Corrientes, Argentina. (Presentación oral)

Bianchinotti, V., González, P., Robaina, D., Suárez, G. (2017). “Planteo del modelo *in-vitro* para estudiar la interacción de Lactonas Macrocíclicas y Escarabajos Estercoleros, sobre el desarrollo de la fase de vida libre de los nemátodos gastrointestinales de bovinos”. XLV Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay

BIBLIOGRAFÍA

Adler, N., Bachmann, J., Blanckenhorn, W. U., Floate, K. D., Jensen, J., & Römcke, J. (2016). Effects of ivermectin application on the diversity and function of dung and soil fauna: Regulatory and scientific background information. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(8), 1914-1923. <https://doi.org/10.1002/etc.3308>.

Aksit, D., Korkut, O., Aksoz, E., & Gokbulut, C. (2016). Plasma disposition and faecal excretion of eprinomectin following topical and subcutaneous administration in non-lactating dairy cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, 64(4), 207-211. <https://doi.org/10.1080/00480169.2016.1146172>.

Bang, H. S., Lee, J. H., Kwon, O. S., Na, Y. E., Jang, Y. S., & Kim, W. H. (2005). Effects of paracoprid dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) on the growth of pasture herbage and on the underlying soil. *Applied soil ecology*, 29(2), 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.11.001>.

Basto-Estrella, G. S., Rodríguez-Vivas, R. I., Delfín-González, H., & Reyes-Novelo, E. (2014). Dung beetle (Coleoptera: Scarabaeinae) diversity and seasonality in response to use of macrocyclic lactones at cattle ranches in the Mexican neotropics. *Insect Conservation and Diversity*, 7(1), 73-81. <https://doi.org/10.1111/icad.12035>.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48. doi: [10.18637/jss.v067.i01](https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01).

Bertone, M. A. (2004). Dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae and Geotrupidae) of North Carolina cattle pastures and their implications for pasture improvement. *North Carolina State University Thesis*: 174.

Brown, J., Scholtz, C. H., Janeau, J. L., Grellier, S., & Podwojewski, P. (2010). Dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) can improve soil hydrological properties. *Applied soil ecology*, 46(1), 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.05.010>.

Cruz, M., & Martínez, I. (1998). Effect of male mesadene secretions on females of *Canthon cyanellus cyanellus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Florida Entomologist*, 23-30.

Cruz Rosales, M., Martínez M, I., López-Collado, J., Vargas-Mendoza, M., González-Hernández, H., & Fajersson, P. (2012). Effect of ivermectin on the survival and fecundity of

Euoniticellus intermedius (Coleoptera: Scarabaeidae). *Revista de Biología Tropical*, 60(1), 333-345.

De Farias, P. M., Arellano, L., Hernández, M. I. M., & Ortiz, S. L. (2015). Response of the copro-necrophagous beetle (Coleoptera: Scarabaeinae) assemblage to a range of soil characteristics and livestock management in a tropical landscape. *Journal of Insect Conservation*, 19(5), 947-960. <https://doi.org/10.1007/s10841-015-9812-3>.

De Groot, R. S., Wilson, M. A., & Boumans, R. M. (2002). A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. *Ecological economics*, 41(3), 393-408. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(02\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(02)00089-7).

De La Vega, C., Elizalde, H., & González, M. (2014). Escarabajos estercoleros para la ganadería de la región de Aysén. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias* 29: 88.

Dupuy, J., Chartier, C., Sutra, J. F., & Alvinerie, M. (2001). Eprinomectin in dairy goats: dose influence on plasma levels and excretion in milk. *Parasitology Research*, 87(4), 294-298.

Errouissi, F., & Lumaret, J. P. (2010). Field effects of faecal residues from ivermectin slow-release boluses on the attractiveness of cattle dung to dung beetles. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(4), 433-440. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00891.x>.

Fiel C, & Nari A. (2013) Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control. *Segunda. Montevideo: Hemisferio sur*, 0–752.

Floate, K. D. (2006). Endectocide use in cattle and fecal residues: environmental effects in Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 70(1), 1.

Floate, K. D. (2007). Endectocide residues affect insect attraction to dung from treated cattle: implications for toxicity tests. *Medical and Veterinary entomology*, 21(4), 312-322.

Forbes, A. B. (2013). LongRange™ (eprinomectin 5%) extended-release injection parasiticide and the utility of extended-activity antiparasitics in cattle. *Veterinary parasitology*, 192(4), 308-312. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.036>.

Gillard, P. (1967) Coprophagous beetles in pasture ecosystems. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, 33, 30-34. <http://hdl.handle.net/102.100.100/324003?index=1>

Gonzalez-Vainer, P., & Morelli, E. (1999). Phenology and biology of the dung beetle *Onthophagus hirculus* Mannerheim (Coleoptera: Scarabaeidae). *The Coleopterists' Bulletin*, 303-309.

González-Vainer, P., Morelli, E., & Defeo, O. (2012). Differences in coprophilous beetle communities structure in Sierra de Minas (Uruguay): a mosaic landscape. *Neotropical entomology*, 41(5), 366-374. <https://doi.org/10.1007/s13744-012-0062-8>.

Gregory, N., Gómez, A., Oliveira, T. M. F. D. S., & Nichols, E. (2015). Big dung beetles dig deeper: trait-based consequences for faecal parasite transmission. *International Journal for Parasitology*, 45(2-3), 101-105. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.10.006>.

Grønvold, J., Sommer, C., Hotter, P., & Nansen, P. (1992). Reduced splash dispersal of bovine parasitic nematodes from cow pats by the dung beetle *Diastellopalpus quinque-dens*. *The Journal of parasitology*, 845-848. <https://doi.org/10.2307/3283315>.

Halffter, G., & Edmonds, W. D. (1982). The nesting behavior of dung beetles (Scarabaeinae). An ecological and evolutive approach. *Instituto de Ecología, México, D. F.* 176 pp.

Halley, B. A., VandenHeuvel, W. J., & Wislocki, P. G. (1993). Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. *Veterinary parasitology*, 48(1-4), 109-125.. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90149-H](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90149-H).

Hanski, I., & Cambefort, Y. (eds). (1991) Dung Beetle Ecology. *Princeton, N.J: Princeton University Press*, 481pp

Hintze, J. L., & Nelson, R. D. (1998). Violin plots: a box plot-density trace synergism. *The American Statistician*, 52(2), 181-184.

Holter, P. (1979). Effect of dung-beetles (*Aphodius* spp.) and earthworms on the disappearance of cattle dung. *Oikos*, 393-402. <https://doi.org/10.2307/3544751>.

Hutton, S. A., & Giller, P. S. (2003). The effects of the intensification of agriculture on northern temperate dung beetle communities. *Journal of Applied Ecology*, 40(6), 994-1007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2003.00863.x>.

Iwasa, M., Maruo, T., Ueda, M., & Yamashita, N. (2007). Adverse effects of ivermectin on the dung beetles, *Caccobius jessoensis* Harold, and rare species, *Copris ochus* Motschulsky

and *Copris acutidens* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae), in Japan. *Bulletin of Entomological Research*, 97(6), 619-625. <https://doi.org/10.1017/S0007485307005329>.

Iwasa, M., Maruyama, M., Nakamura, E., Yamashita, N., & Watanabe, A. (2005). Effects of ivermectin on target and non-target dung-breeding flies (Diptera) in cattle dung pats. *Medical entomology and zoology*, 56(3), 191-199. <https://doi.org/https://doi.org/10.7601/mez.56.191>.

Jacobs, C. T., & Scholtz, C. H. (2015). A review on the effect of macrocyclic lactones on dung-dwelling insects: Toxicity of macrocyclic lactones to dung beetles. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 82(1), 1-8. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v82i1.858>.

Jochmann, R., & Blanckenhorn, W. U. (2016). Non-target effects of ivermectin on trophic groups of the cow dung insect community replicated across an agricultural landscape. *Basic and applied ecology*, 17(4), 291-299. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2016.01.001>.

Kazuhira, Y., Hdeaki, K., Takuro, K., & Toshiharu, A. (1991). Nitrogen mineralization and microbial populations in cow dung, dung balls and underlying soil affected by paracoprid dung beetles. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(7), 649-653. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90078-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90078-X).

Legner, E. F., & Warkentin, R. W. (1991). Influence of *Onthophagus gazella* on hornfly, *Haematobia irritans* density in irrigated pastures. *Entomophaga*, 36(4), 547-553.

Liebig, M., Fernandez, Á. A., Blübaum-Gronau, E., Boxall, A., Brinke, M., Carbonell, G., ... & Duis, K. (2010). Environmental risk assessment of ivermectin: a case study. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6(S1), 567-587.

Lifschitz, A., Virkel, G., Imperiale, F., Pis, A., & Lanusse, C. (2002). Fármacos endectocidas: avermectinas y milbemicinas. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España, 545-558.

Lifschitz, A., Nava, S., Mangold, A., Imperiale, F., Ballent, M., Canevari, J., & Lanusse, C. (2016). Eprinomectin accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Pharmacokinetic and efficacy assessment. *Veterinary parasitology*, 215, 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.005>.

- Lumaret, J. P., Errouissi, F., Galtier, P., & Alvinerie, M. (2005). Pour-on formulation of eprinomectin for cattle: Fecal elimination profile and effects on the development of the dung-inhabiting Diptera *Neomyia cornicina* (L.) (Muscidae). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(4), 797-801. <https://doi.org/10.1897/03-583.1>.
- Lumaret, J. P., & Kirk, A. (1987). Ecology of dung beetles in the french mediterranean region (Coleoptera: Scarabaeidae). *Acta Zoológica Mexicana* (N.S.), (24), 1-55. <https://doi.org/10.21829/azm.1987.19242038>.
- Lumaret, J. P., & Bertrand, M. (1985). Effect of excessive accumulation of manure on edaphic arthropods in sheep resting-places [dystrophic system, edaphic mesoarthropods, Scarabaeidae]. *Bulletin d'Ecologie (France)*.
- Manning, P., Slade, E. M., Beynon, S. A., & Lewis, O. T. (2016). Functionally rich dung beetle assemblages are required to provide multiple ecosystem services. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 218, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.11.007>.
- Martínez, I., & Cruz, M. (2009). El uso de químicos veterinarios y agrícolas en la zona ganadera de Xico, centro de Veracruz, México, y el posible impacto ambiental. *Acta zoológica mexicana*, 25(3), 673-681. <https://doi.org/10.21829/azm.2009.253672>.
- Martínez, I. M., Lumaret, J. P., & Cruz, M. R. (2001). Suspected side effects of a herbicide on dung beetle populations (Coleoptera: Scarabaeidae). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 324(11), 989-994.
- Merck. (1996). Ivomec Eprinex (Eprinomectin) Pour-On for Beef and Dairy Cattle: Environmental Assessment. *Report NADA 141-079EA*. Merck and Company, Rahway, NJ, USA.
- Miranda, C. B., Santos, J. D., & Bianchin, I. (2000). The role of *Digitonthophagus gazella* in pasture cleaning and production as a result of burial of cattle dung. *Pasturas Tropicales*, 22(1), 14-18.
- Molento, M. B. (2020). Avaliação seletiva de bovinos para controle do *Rhipicephalus microplus*. *Ars Veterinaria*, 36(1), 01-02.
- Monné, M. (1970). Fauna de los coleópteros del Uruguay. *Tesis Facultad de Agronomía*. Montevideo, Uruguay. 216 pp.

- Morelli, E., Gonzalez-Vainer, P., & Baz, A. (2002). Coprophagous beetles (Coleoptera: Scarabaeoidea) in Uruguayan Prairies: abundance, diversity and seasonal occurrence. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 37(1), 53-57.
- Morelli, E., González-Vainer, P., & Canziani, C. (1996). Nidificación, ciclo de vida y estadios preimaginales de *Sulcophanaeus menelas* (Laporte, 1840) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Elytron (Boletín de la Asociación Europea de Coleopterología)*, 10, 11-22.
- Moczek, A. P. (1998). Horn polyphenism in the beetle *Onthophagus taurus*: larval diet quality and plasticity in parental investment determine adult body size and male horn morphology. *Behavioral Ecology*, 9(6), 636-641.
- Nichols, E., & Gomez, A. (2014). Dung beetles and fecal helminth transmission: patterns, mechanisms and questions. *Parasitology*, 141(5), 614-623. <https://doi.org/10.1017/S0031182013002011>.
- Nichols, E., Spector, S., Louzada, J., Larsen, T., Amezcuita, S., Favila, M. E., & Network, T. S. R. (2008). Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biological conservation*, 141(6), 1461-1474. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.04.011>.
- O’Hea, N. M., Kirwan, L., Giller, P. S., & Finn, J. A. (2010). Lethal and sub-lethal effects of ivermectin on north temperate dung beetles, *Aphodius ater* and *Aphodius rufipes* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Conservation and Diversity*, 3(1), 24-33. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4598.2009.00068.x>.
- Olechowicz, E. (1974). Analysis of a sheep pasture ecosystem in the Pieniny mountains (the Carpathians). X. Sheep dung and the fauna colonizing it. *Ekologia polska*.
- Peterson Jr, A. V. (1977). Expressing the Kaplan-Meier estimator as a function of empirical subsurvival functions. *Journal of the American Statistical Association*, 72(360a), 854-858. <http://dx.doi.org/10.1080/01621459.1977.10479970>
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>
- Riviere, J. E., & Papich, M. G. (Eds.). (2018). *Veterinary pharmacology and therapeutics*. John Wiley & Sons.

- Rohner, P. T., & Moczek, A. P. (2021). Evolutionary and plastic variation in larval growth and digestion reveal the complex underpinnings of size and age at maturation in dung beetles. *Ecology and evolution*, 11(21), 15098-15110. <https://doi.org/10.1002/ece3.8192>
- Saldana, D., Fruechtenicht, C., Baillie, M., Vandemeulebroecke, M., Siadimas, T., Kowski, P., Haesendonckx, P., Black, J., Papadopoulou, P. A., Treis, T., & Albrecht, R. (2021). visR: Clinical Graphs and Tables Adhering to Graphical Principles. R package version 0.2.0.
- Slade, E. M., Mann, D. J., Villanueva, J. F., & Lewis, O. T. (2007). Experimental evidence for the effects of dung beetle functional group richness and composition on ecosystem function in a tropical forest. *Journal of Animal Ecology*, 1094-1104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2007.01296.x>.
- Sommer, C., & Steffansen, B. (1993). Changes with time after treatment in the concentrations of ivermectin in fresh cow dung and in cow pats aged in the field. *Veterinary Parasitology*, 48(1-4), 67-73. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90145-D](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90145-D).
- Sumano, L. H., & Ocampo, C. I. (2006). Farmacología veterinaria. 3ra ed. *MacGraw-Hill Interamericana, México DF, MEX*.
- Sutton, G., Bennett, J., & Bateman, M. (2014). Effects of ivermectin residues on dung invertebrate communities in a UK farmland habitat. *Insect Conservation and Diversity*, 7(1), 64-72. <https://doi.org/10.1111/icad.12030>.
- Verdú, J. R., Cortez, V., Ortiz, A. J., González-Rodríguez, E., Martínez-Pinna, J., Lumaret, J. P., Lobo, J. M., Numa, C. & Sánchez-Piñero, F. (2015). Low doses of ivermectin cause sensory and locomotor disorders in dung beetles. *Scientific reports*, 5(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep13912>.
- Verdú, J. R., Sánchez-Piñero, F., Lobo, J. M., & Cortez, V. (2020). Evaluating long-term ivermectin use and the role of dung beetles in reducing short-term CH₄ and CO₂ emissions from livestock faeces: a mesocosm design under Mediterranean conditions. *Ecological Entomology*, 45(1), 109-120. <https://doi.org/10.1111/een.12777>.
- Waller, P. J. (2006). Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal feed science and technology*, 126(3-4), 277-289. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.007>.

Wardhaugh, K. G., Longstaff, B. C., & Morton, R. (2001). A comparison of the development and survival of the dung beetle, *Onthophagus taurus* (Schreb.) when fed on the faeces of cattle treated with pour-on formulations of eprinomectin or moxidectin. *Veterinary Parasitology*, 99(2), 155-168. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00451-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00451-4).

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., Grolemond, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T. L., Miller, E., Bache, SM., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D. P., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K., & Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. doi: [10.21105/joss.01686](https://doi.org/10.21105/joss.01686).

Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., & Sangster, N. C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in parasitology*, 20(10), 469-476. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010>.