



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias

Programa

Licenciatura en Biotecnología

**“Embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por el
influyente y efluente de la planta de tratamiento de aguas
residuales del Hospital Ángeles de Puebla sobre *Danio
rerio*”**

**Tesis que para obtener el grado de Licenciada en
Biotecnología**

Presenta:

Paulina Tenorio Chávez

Asesor:

Doctor Leobardo Manuel Gómez Oliván

Coasesor:

Doctor José Fernando Méndez Sánchez



Toluca, Estado de México, 2020

*Dedicado a mis papás y a mi hermana,
por su amor*

*Contemplando el futuro, vasto y brillante, pienso que la luz que me guía y me
sonríe es su amor y que sólo vale mientras pueda sostenerles la mirada*

Agradecimientos

A mis papás, gracias por cuidarme con tanto amor, por entregarme tiempo de sus vidas y por procurar que nada me faltara, aunque todas las palabras me parecen insuficientes para expresar cuanto los valoro. También por regalarme unas raíces fuertes que me permiten descubrir el mundo sin que estas se debiliten con la distancia; por mostrarme la vida a través de sus valores, los cuales me hacen ser quien soy más que cualquier otra cosa. Les tengo a ustedes y con ello razones de sobra para agradecer a la vida.

A mi hermana, Silvi, sabes cuanto significas para mi, gracias por ser mi rayito de sol a diario, por estar conmigo a cada paso, por ser el mejor regalo de la vida y la persona más imprescindible en el mundo. Te agradezco, especialmente, por ayudarme con la parte creativa y artística, eres muy talentosa.

Al Dr. Leobardo Gómez, por todo el apoyo que me ha dado en cada uno de los proyectos en lo que he tenido la oportunidad de involucrarme; por compartir conmigo su conocimiento y experiencia; por orientarme en el gran palacio que supone la investigación. Al Dr. Fernando Méndez, por apoyarme en el camino de este trabajo y por compartir su conocimiento a lo largo de mi vida universitaria.

A mis revisores por sus comentarios sobre mi trabajo, Dr. Josele Flores gracias por su apoyo.

A la Dra. Nely San Juan y Dra. María Dolores Hernández, por sus consejos, por el tiempo que dedicaron a apoyar este proyecto y por compartir sus recursos y conocimientos conmigo.

A mis compañeros del laboratorio de toxicología, en especial a Carmen, Livier, Manuel y Gerardo, porque hicieron posible la realización del experimento. A Jonathan, porque este proyecto comenzó con tu apoyo. A cada uno, gracias por hacer que los días en el laboratorio sean memorables.

A mi familia y amigos en general, por escucharme y alentarme durante estos años de preparación, por las palabras de aliento y esos abrazos cargados de significado que me animan a poner toda mi energía en cada proyecto.

A la Facultad de Química, por permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones y por acogerme entre sus aulas, donde me siento como en casa. A la Facultad de Ciencias, por cada experiencia y conocimiento que obtuve entre sus calmos salones y a mi Universidad, por que mis años estudiando en ella han sido de los mejores.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Marco teórico.....	4
Contaminación	4
Contaminación acuática	4
Contaminantes emergentes	7
Efluentes hospitalarios	8
Ecotoxicología	11
Bioensayos.....	13
Embriotoxicidad y teratogenicidad	14
Estrés oxidativo	16
Evaluación del desarrollo embrionario.....	17
<i>Danio rerio</i>	17
Bioindicador.....	18
Mantenimiento en laboratorio	20
Desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i>	20
Antecedentes.....	33
Efluentes hospitalarios en el mundo.....	33
Efluentes hospitalarios en México	35
Estudios toxicológicos	36
Justificación	38
Hipótesis o pregunta de investigación	38
Objetivos	39
Método	39
Muestras de agua.....	39
Obtención de las muestras de influente y efluente hospitalario	39
Caracterización del influente y efluente hospitalario	40
Estudio de embriotoxicidad y teratogenicidad.....	41
Mantenimiento de los progenitores	41
Producción de ovocitos y fecundación.....	41
Estandarización de condiciones de mantenimiento para los embriones	42
Determinación de las diluciones de exposición	43
Exposición al tóxico	43
Embrioletalidad.....	44
Evaluación del desarrollo embrionario.....	45
Evaluación de malformaciones y efectos teratogénico.....	46
Análisis estadísticos.....	47

Resultados	47
Análisis del influente y efluente de la planta de tratamiento del Hospital Ángeles, Puebla, México	47
Caracterización fisicoquímica del influente y efluente.....	47
Cuantificación de fármacos encontrados en el influente y el efluente	49
Estudio toxicológico	50
Datos de embrioletalidad y teratogenicidad	50
Principales alteraciones teratogénicas y frecuencia de las mismas por exposición al efluente hospitalario.....	54
Evaluación del desarrollo embrionario.....	68
Discusión.....	72
Conclusiones.....	77
Proyecciones.....	77
Referencias	79
Anexos	88
Anexo 1	88
Anexo 2.	89
Anexo 3.	91

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de los periodos de desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al., 1995)	22
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del influente de la planta de tratamiento ...	48
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del efluente de la planta de tratamiento	48
Tabla 4. Concentraciones promedio de fármacos presentes en el influente	49
Tabla 5. Concentraciones promedio de fármacos presentes en el efluente	50
Tabla 6. <i>Datos embriofetalidad y teratogenia del influente</i>	51
Tabla 7. Datos embriofetalidad y teratogenia del efluente	52
Tabla 8. Análisis ANOVA de los promedios de puntuación morfológica de los organismos expuestos a influente.	69
Tabla 9. Análisis ANOVA de los promedios de puntuación morfológica de los organismos expuestos a efluente.	71

Índice de figuras

Figura 1. Dimorfismo sexual de <i>Danio rerio</i> (Peña, 2008).....	18
Figura 2. División meroblástica discoidal de un embrión de pez cebra	21
Figura 3. Primer periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).....	22
Figura 4. Segundo periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).....	23
Figura 5. Tercer periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).....	24
Figura 6. Cuarto periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).....	25
Figura 7. Quinto periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).....	27
Figura 8. Sexto periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).....	30
Figura 9. Séptimo periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).....	30
Figura 10. Viabilidad de embrión de <i>Danio rerio</i>	42
Figura 11. Embriones en estadio de domo a las 4 hpf	44
Figura 12. Embrión de <i>Danio rerio</i> coagulado (Zhu et al., 2018).....	45
Figura 13. Embriones expuestos a diferentes concentraciones del influente.	53
Figura 14. Embriones expuestos a diferentes concentraciones del efluente.	53
Figura 15. Frecuencia de malformaciones presentadas por la exposición al influente	54
Figura 16. Frecuencia de malformaciones presentadas por la exposición al efluente	55
Figura 17. Malformaciones presentes en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos al influente.....	61
Figura 18. Malformaciones presentes en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos al efluente.....	68
Figura 19. Promedios de puntuación morfológica en embriones expuestos al influente.....	70
Figura 20. Promedios de puntuación morfológica en embriones expuestos al efluente.....	72
Figura 21. Puntuación general de morfología para <i>D. rerio</i> por Hermsen et al. en 2011.....	88
Figura 22. Puntaje general de morfología por Luja et al., 2019.....	90
Figura 23. Malformaciones reportadas por Hermsen et al., 2011 para <i>D. rerio</i>	91

Abreviaturas

CE₅₀	Concentración letal media
CL₅₀	Concentración efectiva media
DBO	Demanda química de oxígeno
DQO	Demanda bioquímica de oxígeno
HPF	Horas post fertilización
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IT	Índice teratogénico
PTAR	Planta tratadora de aguas residuales
SNC	Sistema nervioso central

Resumen

Los efluentes hospitalarios tienen una composición variada, los cuales se descargan muchas veces sin un tratamiento adecuado en el alcantarillado municipal, a pesar de tener la capacidad de causar efectos adversos sobre los organismos, entre los cuales están embriofetotoxicidad y teratogenicidad.

Las pruebas de embriotoxicidad en los peces proporcionan información sobre la toxicidad de compuestos y mezclas en un organismo completo en etapas tempranas del desarrollo. Por su parte el pez cebra presenta múltiples ventajas en estudios de embriotoxicidad y teratogenicidad.

En este estudio se expusieron embriones de *Danio rerio* a diferentes concentraciones tanto del influente como del efluente de la PTAR del Hospital Ángeles, el ensayo se realizó de acuerdo a la Guía para el ensayo de productos químicos 236 - en embriones de peces: prueba de toxicidad aguda (FET) de la OCDE. Las concentraciones del influente a las que fueron expuestos son 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.3 y 3.5%; y las del efluente 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.3, 2.5, 3.0 y 3.5%. A partir de los ensayos se obtuvo la CL_{50} de ambas muestras, la del influente fue de 1.466% y la del efluente de 2.484%; en cuanto a las CE_{50} malformaciones el influente presentó el valor de 3.468% y el efluente de 6.096%; el IT de cada una de las muestras resultó ser de 0.423 y de 0.407 respectivamente, lo cual determina que ambas muestras producen principalmente efectos letales en el embrión. La observación de los organismos a los diferentes tiempos de desarrollo arrojó la presencia de diversas malformaciones como: eclosión prematura, no eclosión, deformaciones en la corda, deformación de cola, deformaciones del saco vitelino y edemas en el pericardio, hipopigmentación del cuerpo, las cuales se presentaron en ambas muestras. Los riesgos que representan este tipo de aguas para la supervivencia de organismos vivos, así como la presencia de malformaciones en los mismos, son indicadores de referencia para una futura normatividad enfocada en el adecuado tratamiento de efluentes hospitalarios.

Introducción

La contaminación del agua es uno de los problemas más frecuentes y de mayor gravedad en la actualidad, al ser este el recurso más importante para la vida. Existen distintas fuentes que contaminan el agua como lo son las actividades agropecuarias, la industria, el agua residual de uso doméstico (Quintero, 2017); así como los efluentes hospitalarios, en los cuales se basa este estudio (Kumar et al., 2007).

Los hospitales consumen una gran cantidad de agua, por lo que también generan grandes cantidades de aguas residuales, las cuales contienen una gran variedad de contaminantes (Ramos, 2008); entre los que se encuentran: productos químicos, metales pesados, desinfectantes, esterilizadores, detergentes, marcadores radiactivos y agentes de contraste, así como fármacos y sus metabolitos (Luja et al., 2019). Dichos contaminantes, usualmente, no son eliminados en su totalidad por las plantas tratadoras de agua, por lo que se introducen a los ambientes acuáticos (León, 2015). El agua proveniente de la planta de tratamiento, es decir, el agua que ha sido tratada, es denominada efluente (Jiménez, 2001). Estos efluentes representan uno de los grupos de aguas residuales más tóxicas por tratarse de mezclas complejas (Castro et al., 2015). Su toxicidad es resultado de la exposición a más de una sustancia, es decir, a una mezcla de varios compuestos, los cuales por sí mismos son capaces de causar toxicidad (Islas-Flores et al., 2017; Neri-Cruz et al., 2015). Una vez que se introducen al ambiente los compuestos contaminantes interactúan con otros y con factores abióticos; después de lo cual pueden tener un impacto negativo sobre las especies acuáticas, como lesiones genéticas, daño a órganos, problemas de reproducción, cambios en el comportamiento, alteraciones bioquímicas (Oliveira et al., 2017); así como generar especies reactivas de oxígeno, las cuales generan estrés oxidativo (Li y Lin, 2015), el cual si se presenta durante el desarrollo embrionario genera embriotoxicidad y teratogenicidad, manifestándose con la muerte de los organismos y con malformaciones en los mismos, los efectos mencionados son de los más evidentes ante la exposición a sustancias tóxicas (Oliveira et al., 2017). En este sentido, la presencia de malformaciones o de alteraciones fisiológicas en embriones expuestos es un

indicador de referencia para una futura normatividad enfocada en el adecuado tratamiento de efluentes hospitalarios.

Por otro lado, *Danio rerio* como modelo animal ha tomado fuerza en la determinación de sustancias con potencial embriotóxico y teratogénico, principalmente porque estas sustancias afectan etapas del desarrollo comunes en todos los vertebrados (Kimmel et al., 1995).

En México se han realizado estudios con organismos acuáticos de embriotoxicidad y teratogenicidad como consecuencia de la exposición a efluente hospitalario (Luja et al., 2019; Pérez et al., 2018), aunque las investigaciones acerca de estos compuestos son muy recientes, se espera que sean precisamente los estudios al respecto los que lleven a considerar la regulación de dichos compuestos. Es en esta parte donde se integra la biotecnología, centrada en los ecosistemas y las ciencias ambientales, para contribuir en la descontaminación, depuración y saneamiento de las aguas residuales; con base en los estudios ecotoxicológicos que reiteran la importancia del diseño de nuevas estrategias basadas en el uso de recursos biotecnológicos para la eliminación de compuestos contaminantes, así como para la regulación de los mismos.

El objetivo de este estudio fue evaluar la embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por el influente y efluente de la planta de tratamiento de agua del Hospital Ángeles sobre el bioindicador *Danio rerio*. Lo anterior se llevó a cabo mediante la determinación de la CL_{50} y la CE_{50} , estas concentraciones determinaron a su vez la capacidad del influente y del efluente de causar daño teratogénico al calcular el índice teratogénico (CL_{50}/CE_{50}); también, al identificar y cuantificar las malformaciones que se presentaron en *Danio rerio*, se reportaron la incidencia y los tipos de las mismas que las aguas residuales del Hospital Ángeles son capaces de causar. La pregunta de investigación de este estudio radica en determinar la efectividad del tratamiento que se le está dando al agua residual del hospital, por lo tanto, se espera una mayor mortalidad y presencia de malformaciones en el

influyente que en el efluente de la misma debido a la alta concentración de fármacos del primero.

Marco teórico

Contaminación

La contaminación ambiental se define como cualquier modificación a la composición natural del medio, debida a la introducción directa o indirecta de agentes biológicos, químicos o físicos que no pertenecen al mismo, lo cual ocasiona efectos nocivos en los ecosistemas, así como en la salud pública y ambiental, ya que dificulta la provisión de recursos de buena calidad para el bienestar de los mismos (Gómez et al., 2018; Quintero, 2017; Anwar, Hakeem, Alharby y Alghamdi, 2018).

Estas modificaciones en el medio son ocasionadas principalmente por actividades antropogénicas como lo son la producción industrial, el transporte, actividades agrícolas, el consumo de fármacos y el uso de productos de cuidado personal; debido a las cuales se liberan en el medio compuestos que no pertenecen al mismo, estos, una vez que se encuentran en el medio natural, son llamados xenobióticos (Namihira, 2004). Dichos compuestos se convierten en una amenaza para los ecosistemas, ya que la contaminación es la causa de algunas de las enfermedades y de condiciones desfavorables presentes en los organismos, causando en ocasiones la muerte de los mismos (OMS, 2006).

Contaminación acuática

La contaminación del agua está definida como la introducción de materia o de determinadas condiciones sobre el agua, lo cual de manera directa o indirecta implica la alteración de la calidad de la misma en relación a sus usos posteriores y a sus servicios ambientales (Díaz y Gómez, 2013).

El problema de la contaminación acuática es de importancia debido a que el agua que satisface los servicios municipales, así como el agua usada para la producción de alimentos, debe ser salubre y de fácil acceso (OMS, 2006). Tener la calidad deseada en el agua se dificulta con la introducción de nuevas sustancias para las cuales no se cuenta con un tratamiento de eliminación, para implementación de nuevas técnicas de tratamiento debe analizarse la seguridad de cada una de estas sustancias y comenzar a tratar las sustancias prioritarias, es decir, de aquellas que se tengan estudios de su toxicidad (Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, 2008).

De acuerdo con la Organización Mundial de Salud, en países en vías de desarrollo sólo dos de cada diez descargas de aguas residuales reciben algún tratamiento antes de ser vertidas al ambiente, cifra que no aumenta demasiado en países desarrollados, donde sólo son tratadas cuatro de cada diez descargas (OMS, 2006). Por otro lado, en el agua que si va a las plantas de tratamiento no se eliminan en su totalidad algunos de estos compuestos, principalmente aquellos que no se encuentran regulados por la legislación, es decir, los contaminantes emergentes (León, 2015). La contaminación por efluentes, al tratarse de descargas continuas, provoca que los contaminantes se mantengan de manera constante en el ambiente (Barceló, 2003).

El agua, al ser uno de los recursos más utilizados, resulta contaminada después de cada uso por parte del ser humano, pues se tiene que del agua dulce disponible se usa aproximadamente el 70% en actividades agrícolas, un 20% en actividades industriales y el restante 10% para el consumo humano (Solis, 2013). Todas estas actividades antropogénicas generan aguas de residuo, que se encuentran contaminadas con compuestos como pesticidas, metales pesados, compuestos nitrogenados, especies cloradas, químicos industriales, fármacos y metabolitos de los mismos (San Juan, 2013). Cada uno de los usos del agua trae como consecuencia descargas contaminadas, estas se clasifican de acuerdo a su origen en municipales, agrícolas e industriales, estando incluidos dentro de las municipales

aquellas que provienen de los hospitales ya que desembocan en ellas, se mezclan y van a la misma planta de tratamiento, a pesar de ser una mezcla de diversas sustancias químicas y agentes biológico-infecciosos (Solis, 2013). El efluente hospitalario está definido como el agua que ha recibido tratamiento dentro de la PTAR del hospital y que se descarga en el alcantarillado municipal (Jiménez, 2001). En este estudio consideramos los efluentes hospitalarios como otro tipo de descarga contaminada.

En este estudio es de importancia resaltar que en México los residuos hospitalarios se desechan mayoritariamente sin un tratamiento previo, y sus componentes, al verterse en el tren de tratamiento de aguas residuales degeneran la calidad del agua total y por lo tanto disminuyen la eficacia de los tratamientos (Kookana et al., 2014). Es por ello que se requiere conocer la composición de este tipo de efluentes, ya que los residuos sanitarios contienen una gran diversidad de compuestos farmacéuticos, además en altas concentraciones, por ello es de importancia la presencia de plantas tratadoras de agua en los hospitales (León, 2015), las cuales arrojen efluentes de calidad equiparable a la de los efluentes municipales, para así contribuir con un correcto tratamiento posterior, así evitando que el agua que se vierte en los cuerpos de agua y en el suministro de agua potable se vea peligrosamente contaminada (OMS, 2006).

Recientemente, la preocupación por el saneamiento y el reciclaje del agua potable ha crecido debido a que el problema de la escasez de agua va en aumento, a la par del crecimiento poblacional, el cambio climático y la urbanización (OMS, 2019). El problema es ya tan extendido que la OMS estima que en 2025, la mitad de la población mundial vivirá en zonas con escasez de agua (OMS, 2006). Todo lo mencionado anteriormente convierte a los planes para mejorar las estrategias de reutilización de aguas residuales en una prioridad, ya que de lo contrario el agua reutilizada, de no recibir el tratamiento adecuado, no llegará al suministro con la calidad deseable (OMS, 2019). La mala calidad del agua tratada o no tratada puede causar efectos adversos en los organismos y en el ser humano cuando se vierte al

medio ambiente y al suministro de agua potable (OMS, 2019). Algunos de los efectos negativos que se presentan en los organismos vivos expuestos al agua contaminada son el daño teratogénico y genotóxico, daño a órganos, estrés oxidativo, daño a biomoléculas e incluso la muerte (Pérez et al., 2018).

Contaminantes emergentes

En años recientes, debido al incremento de la población y al mejoramiento del estilo de vida del ser humano, las actividades antropogénicas han traído como consecuencia el aumento de una serie de contaminantes, que a pesar de haberse utilizado y liberado al ambiente durante décadas, es hasta años recientes que se han detectado y se han comenzado a considerar como xenobióticos, son llamados contaminantes emergentes (Elizalde et al., 2017); los cuales no se encuentran regulados, pero son candidatos para su futura regulación, dependiendo de investigaciones sobre sus efectos sobre la salud de los organismos y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia (Tejada et al., 2014).

Los contaminantes emergentes se mantienen vigentes en el agua debido a que, al no tratarse de compuestos presentes en la legislación, no existen mecanismos para su eliminación en aguas residuales, por lo que dichos contaminantes se encuentran presentes incluso en los efluentes de las plantas tratadoras de agua (Tejada et al., 2014).

Dentro de los contaminantes emergentes se encuentran fungicidas, herbicidas, insecticidas, metales pesados, productos de higiene personal, fármacos (Tejada et al., 2014), surfactantes, aditivos industriales, esteroides, hormonas, y subproductos de la desinfección del agua (Díaz y Gómez, 2013).

Entre los contaminantes emergentes se encuentran los fármacos, los cuales son uno de los principales problemas de los efluentes de tipo hospitalario, dichos compuestos además son persistentes en el medio ya que se diseñan para mantener

su estructura química inalterada el tiempo suficientemente para ejercer su trabajo terapéutico, por lo tanto, una vez que entran en los cuerpos de agua persisten en ellos (León, 2015); donde, al estar inmersos en agua, pueden interactuar entre sí y con otros contaminantes presentes en la misma provocando efectos tóxicos en los organismos (Elizalde et al., 2017).

Además los medicamentos son contaminantes especialmente riesgosos para los organismos vivos, ya que al estar diseñados para tener una ruta y una acción específica tanto en los seres humanos como en los animales, presentan efectos indeseables en organismos no blanco (León, 2015). Ante la presencia de fármacos en el ecosistema los organismos tienen como respuesta efectos adversos, entre los cuales se han reportado: falla renal, resistencia a antibióticos, desordenes endócrinos, fallos en la reproducción, cambios en el crecimiento y desarrollo, estrés oxidativo e incluso la muerte (Quintero, 2017), así como cambios morfológicos y feminización (Quesada et. al., 2009).

Este estudio se enfocó en los fármacos como componentes del efluente hospitalario, con el fin de conocer los tipos y cantidades de fármacos que se encuentran en este tipo de descargas, así como para comparar la calidad del agua que entra a la planta de tratamiento del hospital (influyente) y la calidad del agua que se arroja al sistema de drenaje (efluente), así como para determinar la toxicidad de ambas muestras.

Efluentes hospitalarios

Los efluentes hospitalarios o aguas residuales hospitalarias son provenientes de descargas del desagüe de estas instalaciones, las cuales tienen una composición variada y han sufrido una degradación en su calidad original (León, 2015).

Dentro del hospital el agua es uno de los recursos fundamentales, pues muchas actividades prioritarias dentro de los mismos requieren de este recurso, el cual se utiliza para consumo humano, aseo, limpieza, desinfección, esterilización, lavado

de tejidos, regaderas y sanitarios (León, 2015). Una vez que se le dan todos y cada uno de los usos que le confieren, el agua ya no presenta la misma calidad y sanidad que cuando entra al hospital como agua potable, sobre todo por el tipo de compuestos que son desechados tanto por los pacientes como por el personal, entre desechos de quirófano, de consultorios, laboratorios y en los desechos sanitarios como la orina y heces de los pacientes, así como el agua de limpieza de las instalaciones y de los instrumentos, los cuales están contaminados con todo tipo de sustancias como lo son antisépticos y fármacos (León, 2015).

Un hospital consume diariamente hasta ocho veces más agua que el promedio del consumo doméstico diario por persona y produce de 250 a 1400 litros de aguas residuales por cama por día (Ramos, 2008). Esta gran cantidad de vertidos hospitalarios apunta a la necesidad de su caracterización y de su tratamiento antes de desembocar en las redes de saneamiento (Luja, et al., 2019).

Las aguas residuales hospitalarias son variables y su composición depende de factores como la cantidad de pacientes y las enfermedades ahí tratadas (León, 2015). Este tipo de efluentes tienen en su composición desechos sanitarios, los cuales están clasificados por la OMS de la siguiente manera (León, 2015):

- Desechos infecciosos: contienen patógenos en suficiente cantidad o concentración para causar enfermedad.
- Desechos patológicos: tejidos, órganos, partes del cuerpo, fetos, sangre y fluidos corporales.
- Desechos farmacéuticos: se refiere a medicamentos, drogas, vacunas y sueros expirados, sin uso, derramados o contaminados que no van a ser utilizados, así como los materiales descartables utilizados para su manipulación y envasado.
- Desechos genotóxicos: desechos con propiedades mutagénicas, teratogénicas o carcinogénicas. Su principal exponente son las drogas citotóxicas antineoplásicas y materiales contaminados con ellas.

- Desechos químicos: se consideran peligrosos si se les considera tóxicos, corrosivos, inflamables, reactivos o genotóxicos.
- Desechos con metales pesados.
- Desechos radioactivos: incluye todos los materiales contaminados con radionúclidos de fuentes abiertas.

Este tipo de aguas residuales son consideradas con gran potencial toxicológico, pues se trata de mezclas complejas (Castro et al., 2015). Se ha reportado que tienen la capacidad de causar efectos adversos sobre los organismos incluso a bajas concentraciones (Solis, 2013).

Los contaminantes presentes en el agua residual pueden interactuar con otras sustancias presentes en los efluentes o en el medio y de acuerdo a la interacción que presenten pueden tener efectos de adición, cuando el efecto producido por la combinación de dos o más xenobióticos, es la suma de las respuestas individuales esperadas; sinergismo, cuando la exposición simultánea de dos agentes causa un drástico incremento en el efecto tóxico aún mayor que la suma de ambos; antagonismo, cuando la exposición a uno de los xenobióticos resulta en una reducción en el efecto de otro o de potenciación, cuando una sustancia que no es tóxica incrementa la toxicidad de otra que si lo es (Peña et al., 2001).

Es importante, para el desarrollo de una estrategia de eliminación de compuestos prioritarios en aguas hospitalarias, primero la identificación y cuantificación de los tipos y la cantidad de fármacos que se descargan en el drenaje municipal (Quesada et al., 2009).

Este tipo de efluentes es uno de los más difíciles de tratar adecuadamente, ya que, al contener compuestos poco biodegradables requieren no sólo de tratamientos biológicos, sino también de métodos físicoquímicos para lograr oxidar los contaminantes y bajar sus concentraciones por debajo de los límites aceptables. Lo anterior se hace evidente con la baja relación DBO (demanda bioquímica de

oxígeno) / DQO (demanda química de oxígeno) que presentan (León, 2015); donde la Demanda Bioquímica de Oxígeno está definida como la cantidad de oxígeno que hay que proporcionar a un agua residual para oxidar, por vía biológica, la materia orgánica presente sin que se alcance el estado anaerobio (León, 2015) y la DQO es la cantidad de oxígeno total requerido por oxidación química de los compuestos presentes en la muestra (Peganos et al., 2012). Este cociente permite comparar la cantidad de oxígeno requerido para la oxidación por microorganismos con el oxígeno total requerido por oxidación química de los compuestos presentes en la muestra; (León, 2015). De acuerdo al valor arrojado por este cociente se determina la biodegradabilidad del agua residual, si esta tiene un valor > 0.4 se trata de un residual altamente biodegradable, si esta entre 0.2 y 0.4 se está en una situación intermedia, en la cual se recomienda que solo algunos de los tratamientos sean biológicos, si resulta ser < 0.2 el residual no es biodegradable o lo es muy poco, por lo que se recomienda métodos físicoquímicos de tratamiento (Vera et al., 2013).

Debido a la presencia de compuestos poco biodegradables en las aguas residuales se busca implementar nuevos métodos de tratamiento, para lo cual es necesario basarse en los datos de consumo de la población, en conjunto con los datos reportados sobre la incidencia ambiental, persistencia, bioacumulación y la toxicidad de cada fármaco (Castro et al., 2015), con esos datos se podrán identificar sustancias prioritarias para su eliminación de acuerdo a los datos de la zona de muestreo y así permitir a las autoridades ambientales desarrollar estrategias enfocadas en aquellos contaminantes que representen un mayor riesgo de acuerdo a la incidencia de los mismos en los cuerpos de agua (Quesada et al., 2009).

Ecotoxicología

Esta disciplina se enfoca en el estudio multidisciplinario del origen, distribución y los efectos de un agente contaminante sobre los organismos vivos, apoyándose en técnicas de toxicología, química y ecología para la descripción de las interacciones

que se dan entre los contaminantes, los organismos y con los ecosistemas (Peña, 2008).

Se apoya en el uso de biomodelos y biomarcadores en ensayos ecotoxicológicos que permiten el diagnóstico de problemas ambientales, el monitoreo de sustancias contaminantes, así como la implementación de biomarcadores que permiten la prevención de riesgos causados por la contaminación (León, 2015).

Entre lo que estudia esta disciplina se encuentra la toxicidad, definida como la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre los organismos dependiendo de las propiedades químicas del compuesto, concentración, tiempo de exposición, frecuencia de exposición y su relación con el ciclo de vida del organismo (Álvarez, 2011). Puede ser aguda, es decir, que produce un efecto en tiempo relativamente corto (dentro de cuatro días para peces y otros vertebrados) (León, 2015); o crónica, que produce efectos a largo plazo, que pueden estar relacionados con cambios en crecimiento, metabolismo, mutaciones e incluso la muerte de los organismos expuestos ocasionado por la exposición a un agente tóxico (León, 2015).

La ecotoxicología realiza ensayos de toxicidad para determinar el efecto de un material sobre un grupo de organismos seleccionados, bajo condiciones definidas, midiendo las proporciones de organismos afectados y el grado del efecto luego de la exposición a la muestra (León, 2015). Dichos ensayos se suelen determinar parámetros como la CE_{50} , es decir, concentración efectiva o de inhibición media, que es la concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo (Ronco et al., 2004); también la CL_{50} o concentración letal media, que es la concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima letal para el 50% de los organismos de ensayo (Ronco et al., 2004). Para estudios específicos en embriones también se determina el IT, índice de teratogenicidad, que es el resultado del cociente de la concentración letal media entre la concentración efectiva media (de malformaciones), es decir,

$CL_{50}/CE_{50(\text{malformaciones})}$ (Ronco et al., 2004); si el resultado del cociente es un número >1 se considera que la sustancia es capaz de inducir efectos teratogénicos, de lo contrario se considera la sustancia produce principalmente efectos letales en el embrión (Luja et al., 2019).

Bioensayos

Los bioensayos son herramientas de diagnóstico que tienen la función de determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas (León, 2015). Los que se realizan en organismos acuáticos tienen especial importancia, ya que son los únicos que pueden determinar la toxicidad de los xenobióticos encontrados en cuerpos de agua y su relación con el ecosistema (Peña, 2008).

La presencia de sustancias exógenas implica un riesgo para el equilibrio del ecosistema, así como para la salud de los organismos que lo habitan, de ahí la importancia de la detección de los contaminantes y de la evaluación de sus efectos adversos (Quesada et al., 2009). Para ello se requiere hacer ensayos *in vivo* sobre los organismos bioindicadores, con el fin de corroborar que el daño efectivamente es causado por el contaminante, dichos ensayos se realizan mediante el análisis de los cambios que se presentan en los biomarcadores de interés como pueden ser el daño a nivel molecular, bioquímico, celular e histológico (León, 2015).

Los bioindicadores están definidos como una especie vegetal, hongo o animal, cuya presencia brinda información sobre el impacto que tienen a nivel ecológico las sustancias exógenas que se encuentran en el medio (León, 2015); estos organismos se usan con el objetivo de evaluar las condiciones ambientales y el impacto de estas sobre los organismos vivos, así como para medir la eficacia de las medidas restauradoras de la contaminación (León, 2015).

Para la elección de un organismo como bioindicador se deben tomar en cuenta algunas características (Díaz y Gómez, 2013): 1) que se encuentre suficientemente disperso en el territorio de interés o en un ambiente similar a este; 2) que tenga un tamaño considerable para poder hacer estudios en diversos tejidos y órganos; 3) tolerar los contaminantes a concentraciones similares a las encontradas en el medio sin efectos letales; 4) sobrevivir en condiciones de laboratorio; 5) ser reproducible; 6) sensible al estrés por xenobióticos.

Embriotoxicidad y teratogenicidad

Entre los efectos subletales más evaluados se encuentran la genotoxicidad, embriotoxicidad y teratogénesis (Solis, 2013). Los efectos mencionados tienen en común que son causados por un evento mutagénico, el cual al afectar al material genético y por ende a las moléculas involucradas en la diferenciación celular, tiene consecuencias inmediatas en las etapas tempranas del desarrollo, esto sucede a menudo como consecuencia de la exposición a sustancias tóxicas durante el desarrollo embrionario (Peña, 2008). La toxicidad o teratógenia de los contaminantes genera alteración en la morfogénesis temprana, lo cual influye en la aparición de malformaciones desde estadios tempranos del desarrollo (Álvarez, 2011).

El término embriotoxicidad hace referencia a la capacidad de una sustancia para producir efectos tóxicos en la progenie durante el desarrollo embrionario (Rohwedel et al., 2001), desde la concepción a la etapa fetal. Entre los efectos pueden incluir malformaciones, alteraciones del crecimiento, disfunciones e incluso la muerte.

Entre los efectos de la embriotoxicidad se encuentra la teratogenicidad, la cual se refiere específicamente a las malformaciones producidas por la exposición a agentes tóxicos que se presentan o que permanecen después del periodo de embriogénesis. (Álvarez, 2011). Los compuestos que son capaces de inducir malformaciones en etapas tempranas del desarrollo al exponerse a ellos se conocen

como teratógenos, los cuales interfieren en la organogénesis y en la formación de tejidos (Peña, 2008). La teratogénesis es uno de los efectos más evidentes de la exposición a sustancias tóxicas (Solis, 2013).

El tipo y la magnitud del daño ocasionado por la exposición a tóxicos en los embriones depende de la etapa de la embriogénesis en la que se comience la exposición. Estas etapas son tres (Peña, 2008): 1) fertilización: se inicia la diferenciación celular, si un agente actúa en esta etapa se puede provocar un daño masivo dando lugar a la muerte del embrión; 2) desarrollo embrionario: se lleva a cabo la diferenciación celular y la organogénesis, es en esta fase cuando el embrión se encuentra más sensible a la acción de los teratógenos sin que se vea afectada su viabilidad; 3) desarrollo fetal: es la fase final del desarrollo; en esta etapa el daño puede no ser evidente, sin embargo, se pueden ocasionar alteraciones bioquímicas y genéticas que pueden tener efectos posteriormente sobre el organismo (Peña, 2008).

Algunas de las anomalías que se pueden presentar por efecto de la exposición a tóxicos durante las primeras etapas de desarrollo embrionario son: retraso embrionario, el cual consiste en que el proceso de desarrollo ocurre de manera más lenta de lo normal (Solis, 2013); arresto embrionario (suspensión súbita del proceso de desarrollo embrionario) (Weiss et al., 1986; Solis, 2013); eclosión, retraso o adelanto de la misma es la etapa más sensible al daño teratogénico (Báez, 2005; González, 2005; Peña, 2008); deformidades en columna, cabeza y cola; anormalidades en saco vitelino, edemas, hemorragias, entre otros. La presencia de anormalidades morfológicas o alteraciones fisiológicas en organismos expuestos durante su desarrollo, constituyen un indicador de referencia para la normatividad de sustancias químicas (Solis, 2013).

Estrés oxidativo

Los mecanismos exactos involucrados en la embriotoxicidad y la teratogénesis no se han descubierto a pesar de todas las investigaciones; sin embargo, se estima que pueden deberse a distintas causas como lo son alteraciones en el ADN, inhibición de enzimas específicas, alteraciones en la membrana, modulación del suministro de energía celular, cambios en la señalización celular o el estrés oxidativo (Beckman y Brent, 1984), a menudo es el conjunto factores y de errores lo que produce malformaciones morfológicas o letalidad embrionaria.

Uno de los mecanismos más estudiados de la embriotoxicidad y teratogénesis es el estrés oxidativo, que está definido como el desbalance entre las especies oxidantes (especies reactivas de oxígeno) y el sistema de defensa antioxidante que poseen los seres vivos (Corrales y Muñoz, 2012). La importancia del estrés oxidativo radica en que el efecto tóxico de muchos compuestos esta mediado por su capacidad de inducir la formación de especies reactivas de oxígeno, estas al intentar recuperar su configuración original buscan transferir o donar su electrón no apareado al oxígeno y mediante una serie de reacciones en cadena son capaces de oxidar macromoléculas (Islas, 2013), generando así estrés oxidativo.

El estrés oxidativo está involucrado con la embriotoxicidad debido a que especies reactivas de oxígeno participan en procesos como la apoptosis, la activación de factores de transcripción y la diferenciación celular (Ali, Zeng, Cai, Qiu y Zhang, 2011), esto de manera funcional; pero cuando existe un desbalance a favor de las especies reactivas de oxígeno se presenta toxicidad para las biomoléculas como proteínas, lípidos de membrana y al ADN (Agarwal, Saleh, y Bedaiwy, 2003). De entre los anteriores uno de los más importantes es el daño al material genético, el cual se perfila como uno de los principales causantes de embriotoxicidad y teratogenicidad (Pérez, et al., 2018).

Evaluación del desarrollo embrionario

Para la evaluación de desarrollo embrionario se deben considerar factores como la viabilidad de los huevos y su relación con la exposición al agente tóxico, esta se determina mediante la concentración letal media CL_{50} , la CE_{50} malformaciones, así como el índice teratogénico.

También se considera la evaluación morfológica de los embriones para determinar la presencia de malformaciones, retrasos o adelantos en el desarrollo. Para esta evaluación uno de los sistemas existentes, específicamente para el bioindicador *Danio rerio*, es el desarrollado por Hermsen y colaboradores en 2011, el cual se realizó de manera similar al utilizado para rata por Brown y Fabro en 1981 y comprende el desarrollo normal de un embrión de pez cebra de hasta 72 hpf como lo describen Kimmel et al. 1995. En este sistema la evaluación morfológica se realiza de manera semicuantitativa en cada uno los puntos finales de desarrollo mediante la comparación del embrión expuesto con el de referencia y ambos reciben puntos por cada una de las características distintivas de cada una de las etapas; las variaciones se evalúan con una puntuación más baja, estas variaciones pueden ser un cierto grado de retraso en el desarrollo, malformaciones y otros efectos teratogénicos, los cuales también se registran por separado como presentes o ausentes (Hermsen, Brandhof, Ven y Piersma, 2011).

Danio rerio

Las pruebas de embriotoxicidad en los peces proporcionan información sobre la toxicidad que producen ciertos compuestos en un organismo completo en etapas tempranas del desarrollo (Gasca, 2015).

Los organismos acuáticos se eligen como especie de ensayo debido a su capacidad de filtración, facilidad de cultivo, sensibilidad a daño oxidativo en exposiciones crónicas o concentraciones subletales (Islas, 2013) entre otras. La relevancia del

empleo de peces como organismos de prueba radica en su ubicación y función en los sistemas acuáticos, ya que además de ocupar diferentes posiciones tróficas en los ecosistemas, al tratarse de organismos vertebrados, son normalmente considerados como buenos representantes de organismos de mayor complejidad (León, 2015).

El pez cebra, *Danio rerio*, es un ciprínido tropical dulceacuícola (Rivera, 2006) es nativo del sureste asiático (Quintero, 2017). Los organismos de esta especie tienen las siguientes características: tamaño pequeño (4 - 6 cm de longitud y 2 - 3 g de peso), presentan un color de fondo dorado o plateado, con cinco bandas longitudinales que comienzan detrás del opérculo y llegan hasta el extremo de la aleta caudal, es a esta la característica a la que se debe su nombre (pez cebra), la aleta anal también está rayada, no así la dorsal, su vida media oscila entre los 2 o 3 años (Ayala, 2014). Presentan dimorfismo sexual, siendo la hembra más robusta que el macho, con el vientre más voluminoso y de color plateado (**Fig. 1.**), cuando la hembra está cargada de ovocitos se hacen más evidentes estas diferencias fenotípicas; el macho es más estilizado y su vientre presenta una tonalidad más amarillenta (Wixon, 2000). La madurez sexual se alcanza hacia el tercer mes de vida. Una sola hembra puede poner hasta 200 huevos por semana (Álvarez, 2011).



Figura 1. Dimorfismo sexual de *Danio rerio* (Peña, 2008)

Bioindicador

Este organismo ha sido considerado como un sistema biológico de alerta temprana para la detección de contaminantes en el agua, ya que al ser una especie poco

exigente puede mantenerse fácilmente en laboratorio, sin embargo, reacciona rápidamente a la presencia de contaminantes en el medio (Quintero, 2017). El pez cebra tiene varias ventajas para el estudio de la biología del desarrollo, entre ellas se encuentran: la conservación de los genes del desarrollo a través de los vertebrados (Kimmel et al., 1995), pequeño tamaño (lo que permite mantener grandes cantidades de animales en un área relativamente pequeña), fertilización externa, embriones transparentes (lo que permite la visualización directa del desarrollo), la facilidad con la que se pueden administrar fármacos y productos químicos solubles en agua porque la membrana del huevo es semipermeable, elevada tasa reproductiva (alrededor de 100 huevos por hembra en cada ciclo de ovoposición), ciclo de vida corto, desarrollo embrionario fuera del útero (Solis, 2013), embriogénesis corta (72 h), así como que su ovoposición puede ser inducida (Peña, 2008). Además, este organismo comparte muchos genes con el ser humano (Quintero, 2017); pese a las evidentes diferencias morfológicas y fisiológicas, muchos genes y sus funciones se han conservado a lo largo de la evolución, la similitud genética del pez cebra con los humanos es mayor del 85 % (Ayala, 2014).

Este modelo animal fue propuesto para la realización de estudios experimentales en embriología por primera vez en 1930's por Oppenheimer, pero fue hasta la década de 1950 que se realizaron los primeros trabajos, aunque se volvió popular hasta 1996, al publicarse un estudio de mutaciones que afectan el desarrollo embrionario de *Danio rerio*, el cual le otorgó a Nüsslein-Volhard el Premio Nobel en el mismo año (Ayala, 2014). En cuanto a estudios toxicológicos se tiene el primer antecedente con Dietrich en 1998, fue usado como bioindicador para evaluar el daño embriotóxico y teratogénico en el corazón inducido por muestras de agua; otro estudio fue realizado por Nagel, en 2002, se realizaron pruebas de embriotoxicidad para evaluar el efecto letal, subletal y teratogénico de 34 compuestos (Peña, 2008). Aunado a estos antecedentes la directiva de la Unión Europea, en 2010, incorporó en su Anexo I al pez cebra en el listado de animales empleados en procedimientos experimentales (Ayala, 2014).

Mantenimiento en laboratorio

los organismos adultos se mantienen en aguas en calma, ya que así las prefieren, ligeramente alcalinas ($\text{pH} \approx 8.0$) y su temperatura óptima está en un rango desde los 27°C a los 29°C (Ayala, 2014), y deben mantenerse a temperatura constante, ya que las variaciones en la temperatura (incluso ligeras) pueden provocar diferencias en el potencial reproductivo de los organismos (Peña, 2008).

En el caso de los embriones se ha reportado la importancia de la temperatura en la incubación de los embriones de *Danio rerio*, debido a que las fluctuaciones de esta variable pueden ocasionar cambios en el desarrollo embrionario; en el estudio de Peña en 2008 se estableció como temperatura mínima 25°C y como máxima 33°C , siendo la óptima 27°C . La incubación a una temperatura mayor a 33°C puede provocar anormalidades en los embriones, además la incubación a diferentes intervalos de temperatura puede producir diferencias en las distintas fases del desarrollo, así como modificar el tiempo de embriogénesis (Peña, 2008). Además, la temperatura tiene un papel importante en la disolución, absorción y bioconcentración de algunas sustancias, aumentando su potencial tóxico (Peña, 2008).

Desarrollo embrionario de *Danio rerio*

El desarrollo embrionario del pez cebra ocurre en un periodo de 72 horas; desde la fecundación hasta la eclosión de una larva. En 1995, Kimmell y colaboradores describieron detalladamente este proceso **Tabla 1**. Los siete periodos del desarrollo corresponden a una serie de procesos de división, migración y señalización celular, que son comunes en los vertebrados (Solis, 2013). Durante las etapas de 9, 24, 48 y 72 hpf (horas post fertilización) es posible observar cambios morfológicos, que permiten hacer el seguimiento del desarrollo embrionario (Kimmel, Ballard, Kimmel, Ullmann y Schilling, 1995). Este último es muy rápido, en las primeras 24 horas

después de la fertilización la mayoría de los órganos están desarrollados y en menos de 96 horas eclosiona y reabsorben el vitelo (Álvarez, 2011).

El desarrollo embrionario comienza inmediatamente después de la fecundación, que es cuando comienza la división celular, la cual ocurre únicamente en el polo animal de huevo –blastodisco, que es una región delgada de citoplasma libre de vitelo-; estas divisiones son de tipo meroblástico (**Fig. 2.**), pues estas divisiones celulares no dividen completamente al embrión; además, ya que solo la región del blastodisco del citoplasma dará origen al embrión, se trata de una división discoidal (Gilbert, 2000). Una vez iniciadas las divisiones suceden cada 15 minutos, las primeras doce ocurren en forma sincronizada, estas divisiones dan origen a un cúmulo de células en el polo animal del huevo, este grupo de células constituyen el blastodermo del huevo, estas células tienen conexión abierta entre ellas, por lo que moléculas de tamaño moderado (17 kDa) puedan pasar de un blastómero a otro (Kimmel y Law, 1985).

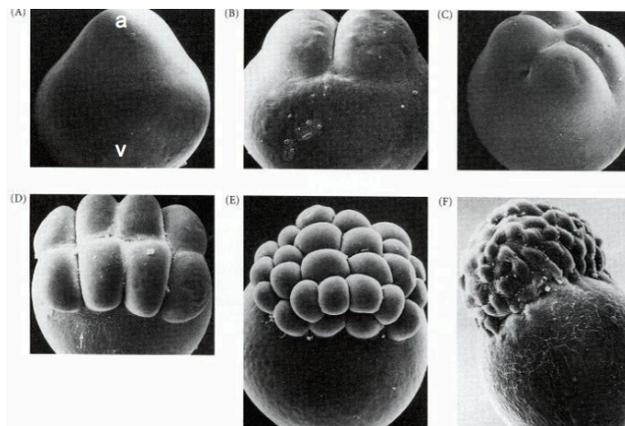
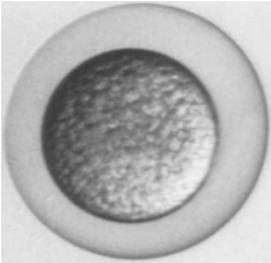


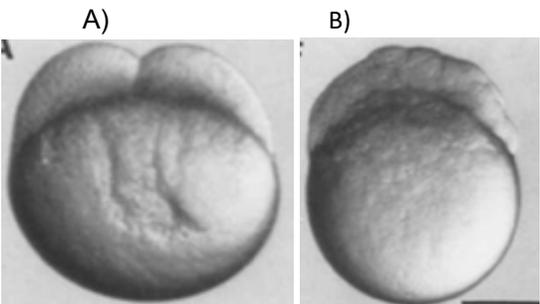
Figura 2. División meroblástica discoidal de un embrión de pez cebra

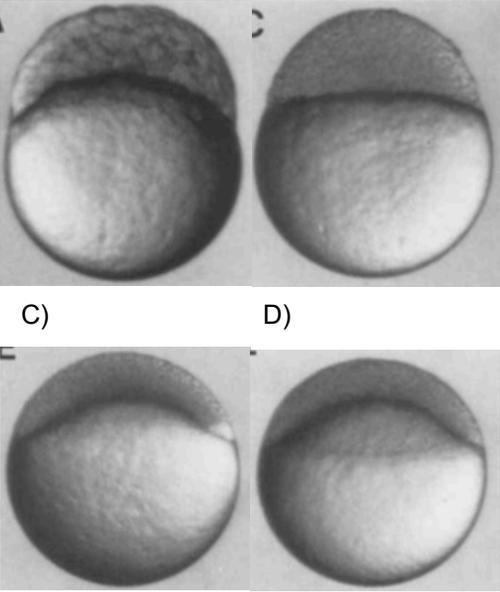
- a) Embrión en estadio de una célula donde el blastodisco (a: polo animal) se distingue en la parte superior y el vitelio (v: polo vegetal) en la parte inferior; b) estadio de dos células; c) cuatro células; d) ocho células; e) treinta y dos y f) sesenta y cuatro (Yañez, 2005).

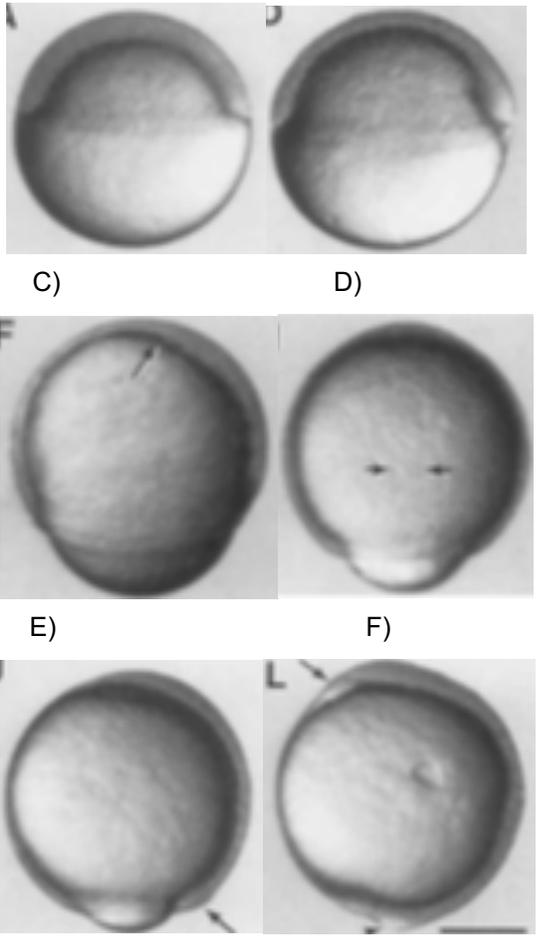
Las etapas de desarrollo embrionario consideradas en estudios de toxicología para *Danio rerio* son siete: cigoto, hendidura, blástula, gástrula, segmentación, faríngrula y eclosión, los cuales se describen a continuación **Tabla 1**. (Peña, 2008):

Tabla 1. Descripción de los periodos de desarrollo embrionario de *Danio rerio* (Kimmel et al., 1995)

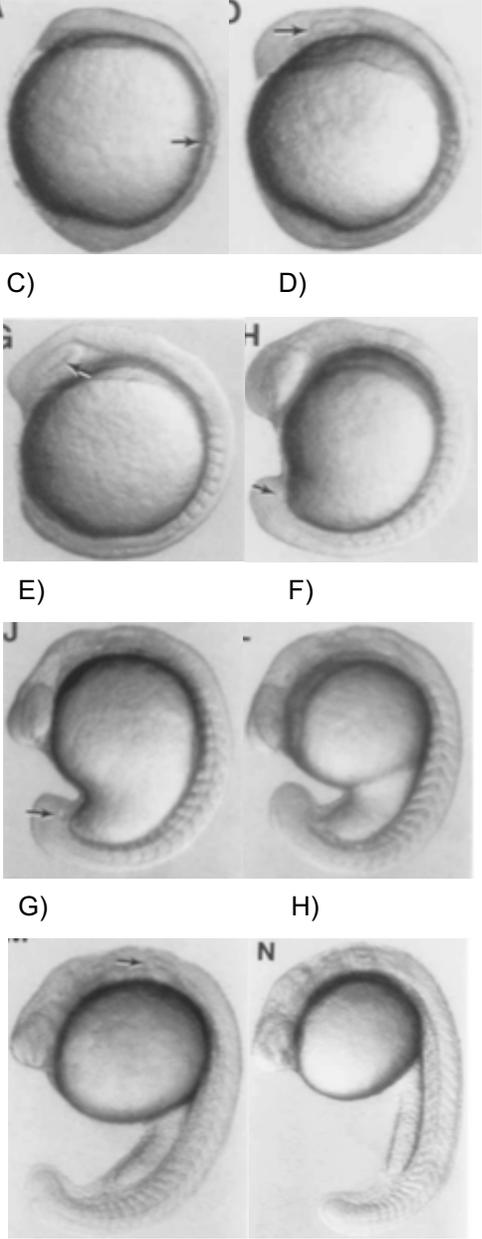
Periodo	Descripción	Imagen
Cigoto	<ul style="list-style-type: none"> - Etapa unicelular, inicia minutos después de la fertilización (0 hpf) - La fecundación produce una reducción instantánea del tamaño del huevo y una pequeña separación entre el corion y la membrana plasmática - La fertilización activa movimientos citoplasmáticos - Se lleva a cabo la proliferación celular del polo animal en el blastodisco, que es una región delgada del citoplasma libre de vitelo 	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>A)</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>B)</p>  </div> </div> <p>Figura 3. Primer periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).</p> <p>A) cigoto inmediatamente después de la fecundación; B) cigoto con el polo animal en la parte superior, aproximadamente 10 minutos después de la fertilización, el citoplasma</p>

<p>Hendedura</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Después de la primera división, las células, o blastómeros, se dividen a intervalos de aproximadamente 15 minutos - Las seis divisiones que comprenden este período frecuentemente ocurren en orientaciones regulares - Inicia cuando las células se encuentran formando una bóveda (domo) en el polo animal de huevo - Se da desde las 2 hpf hasta el estadio escudo a las 5 hpf - Por primera vez, algunas de las células se separan por completo de las demás, estas células son los cuatro blastómeros centrales, el cuarteto que está completamente rodeado por otras 12 células, las cuales son los llamados blastómeros marginales y permanecen conectados a la célula del vitelio por puentes citoplasmáticos - Las hendiduras se dividen por completo la mayoría o la totalidad de los blastómeros no marginales, pero parten de manera incompleta los marginales 	<div style="text-align: center;">  </div> <p>Figura 4. Segundo periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).</p> <p>A) Inicia el periodo de hendedura (3/4 hpf); B) Termina periodo (2 hpf).</p>
-------------------------	---	---

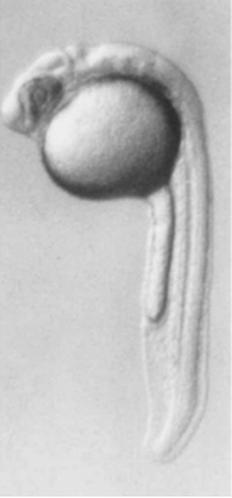
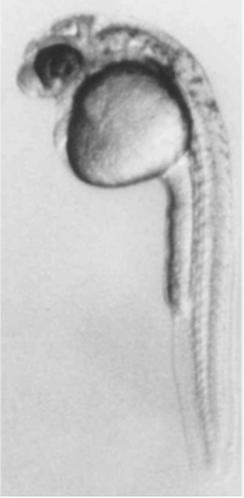
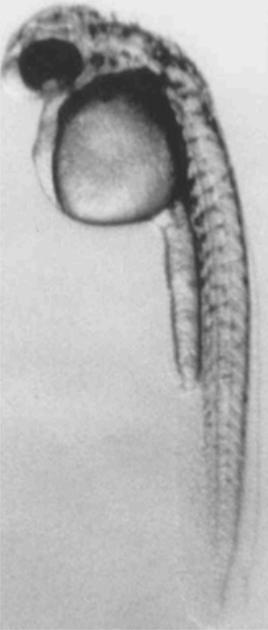
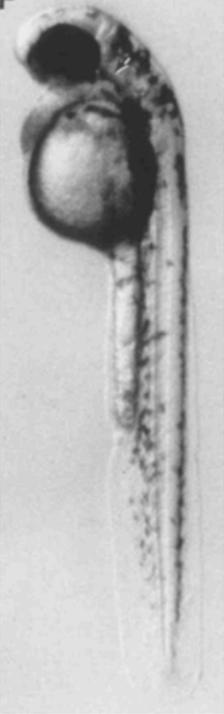
<p>Blástula</p>	<ul style="list-style-type: none"> - El blastodisco comienza a parecer un círculo - El embrión entra en transición formando la capa sincitial del vitelio y comienza la epibolia, la cual continúa durante el período de gastrulación - La orientación de los planos de escisión es indeterminada y está menos organizados que durante el período de escisión - El blastodisco se ve ligeramente elipsoidal - La epibolia comienza a fines de la blástula y es el adelgazamiento y la propagación tanto del vitelio como del blastodisco - El blastodisco se adelgaza considerablemente, cambiando de un montículo de células apiladas a una multicapa de células en forma de copa de espesor casi uniforme - La célula del vitelio cambia de forma, la superficie interna se abulta hacia el polo animal, este cambio de forma es el signo más claro de que está comenzando la epibolia y sirve para aumentar el área de contacto con la superficie interna del blastodisco (etapa de domo) 	<div style="display: flex; flex-wrap: wrap; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">A)</div> <div style="text-align: center;">B)</div> <div style="text-align: center;">C)</div> <div style="text-align: center;">D)</div> </div>  <p>Figura 5. Tercer periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).</p> <p>A) Embrión a las 2.5 hpf, iniciando el periodo de blástula; B) A las 3.5 hpf, comenzando etapa de domo; C) Estadio de domo, 4.3 hpf, comienza epibolia; D) Epibolia al 30%, 4.7 hpf.</p>
------------------------	---	--

<p>Gástrula</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La epibolia continúa y se producen los movimientos morfogénéticos celulares de involución, convergencia y extensión, produciendo las capas germinales primarias y el eje embrionario - El comienzo de la involución define el inicio de la gastrulación, esto ocurre al 50% de epibolia - Los movimientos de convergencia producen una acumulación local de células en una posición a lo largo del anillo germinal, el llamado escudo embrionario - Durante estos eventos, la epibolia se detiene temporalmente, pero después de que se forma el escudo, la epibolia continúa; el margen del blastodermo avanza alrededor de la célula del vitelio para cubrirla por completo - Las células que permanecen en el epiblasto cuando finaliza la gastrulación corresponden al ectodermo definitivo y darán lugar a tejidos como la epidermis, el sistema nervioso central, la cresta neural y las placodas sensoriales - El hipoblasto da lugar a derivados atribuidos clásicamente tanto al mesodermo como al endodermo 	<div style="display: flex; flex-wrap: wrap; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">A)</div> <div style="text-align: center;">B)</div> <div style="text-align: center;">C)</div> <div style="text-align: center;">D)</div> <div style="text-align: center;">E)</div> <div style="text-align: center;">F)</div> </div>  <p>Figura 6. Cuarto periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).</p> <p>A) Inicia gastrulación (5 hpf); B) Los movimientos de convergencia producen una acumulación local de células en una posición a lo largo del anillo germinal, el llamado escudo embrionario; C) - F) El margen del blastodermo avanza alrededor de la célula del vitelio.</p>
------------------------	---	---

	<ul style="list-style-type: none"> - En el momento en que comienza la involución, se producen otros movimientos y reordenamientos tanto en el epiblasto como en el hipoblasto - Durante la convergencia, las células fluyen desde todos los sectores del blastodermo hacia el lado dorsal - Las intercalaciones vuelven a empacar las células en ambas capas, son mediolaterales; efectúan extensión convergente, un estrechamiento y alargamiento del eje embrionario primario - Alrededor de la mitad de la gastrulación, el hipoblasto axial se diferencia claramente del hipoblasto paraxial; paraxial anterior genera músculos para mover los ojos, las mandíbulas y las branquias; gran parte del hipoblasto paraxial está presente como la placa segmentaria que forma somitas - El epiblasto dorsal comienza a engrosarse abruptamente cerca del final de la gastrulación, el primer signo morfológico de desarrollo del sistema nervioso central, la placa neural - Definimos el período de gástrula como el final cuando la epibolia está completa y se ha formado el botón de la cola 	
--	--	--

<p>Segmentación</p>	<ul style="list-style-type: none"> - La epibolia continúa y, además, se producen los movimientos morfogénéticos celulares de involución, convergencia y extensión, produciendo las capas germinales primarias y el eje embrionario - El comienzo de la involución define el inicio de la gastrulación y esto ocurre al 50% de epibolia, como consecuencia aparece una región marginal engrosada denominada anillo germinal - Los movimientos de convergencia producen una acumulación local de células en una posición a lo largo del anillo germinal, el llamado escudo embrionario - Durante estos eventos, la epibolia se detiene temporalmente, pero después de que se forma el escudo, la epibolia continúa; el margen del blastodermo avanza alrededor de la célula del vitelio para cubrirla por completo - La involución produce el anillo germinal al doblar el blastodermo sobre sí mismo. Dentro del anillo germinal hay dos capas germinales: la superior, el epiblasto, continúa alimentando las células hacia la inferior, el hipoblasto, durante la gastrulación. 	 <p>Figura 7. Quinto periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).</p> <p>A) etapa de dos somitas; B) etapa de cuatro somitas, el primordio óptico comienza a mostrarse; C) ocho somitas, el primordio óptico tiene un pliegue horizontal prominente; D) etapa de trece somitas, la</p>
----------------------------	---	--

	<ul style="list-style-type: none"> - Se desarrollan las somitas - Se hacen visibles principios de los órganos primarios - El brote de la cola se vuelve más prominente y el embrión se alarga - Las primeras células se diferencian morfológicamente y aparecen los primeros movimientos del cuerpo - A medida que la cola se extiende, la longitud total del cuerpo del embrión aumenta - A medida que la cola se alarga se endereza - Las somitas aparecen secuencialmente en el tronco y la cola - La placa neural ya está regionalizada cuando comienza el período de segmentación - Al comienzo del período de segmentación, el rudimento cerebral, aunque más grande que el de la médula espinal, parece uniforme a lo largo de su longitud 	<p>célula del vitelio comienza a parecerse a un frijol: E) etapa de quince somitas; F) diecisiete somitas, la extensión del vitelio está claramente delimitada de la parte circular de este a medida que la cola se endereza; G) veinte somitas; H) veinticinco somitas.</p>
--	--	--

<p>Faríngrula</p>	<ul style="list-style-type: none"> -El embrión es una criatura organizada bilateralmente, que ingresa al período de la faríngrula con un notocordio bien desarrollado y un conjunto de somitas recién completado -El nombre del período centra la atención en los primordios de los arcos faríngricos, presentes, difíciles de distinguir individualmente en las primeras etapas - Los arcos faríngricos se desarrollan rápidamente, siete arcos faríngricos en total se desarrollan - Las células de la glándula de eclosión son destacadas de la región pericárdica durante todo el período de la faríngrula - Durante las primeras horas del período faríngrico, el embrión continúa el alargamiento rápido que comenzó a las 15 h, pero luego la tasa de alargamiento disminuye abruptamente - La cabeza se endereza, se levanta dorsalmente hacia arriba con bastante rapidez - La morfogénesis que acompaña al enderezado de la cabeza acorta drásticamente la cabeza - Las aletas comienzan a formarse - Las células pigmentarias se diferencian, los melanóforos comienzan a organizarse en un patrón característico que incluye un 	<div style="display: flex; flex-wrap: wrap;"> <div style="width: 50%; text-align: center;"> <p>A)</p>  </div> <div style="width: 50%; text-align: center;"> <p>B)</p>  </div> <div style="width: 50%; text-align: center;"> <p>C)</p>  </div> <div style="width: 50%; text-align: center;"> <p>D)</p>  </div> </div>
--------------------------	--	--

conjunto bien definido de rayas longitudinales del cuerpo

- El sistema circulatorio se forma, el corazón comienza a latir justo al comienzo del período y forma cámaras bien delineadas, la sangre comienza a circular a través de un conjunto cerrado de canales
- Hay un marcado desarrollo del comportamiento, las flexiones que ocurrieron en miotomas descoordinados durante el período de segmentación tardía se convierten en episodios de natación rítmica

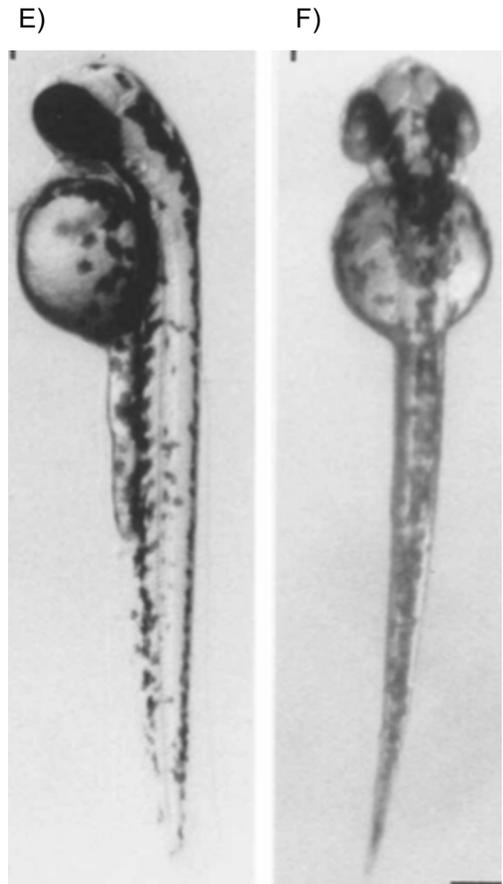
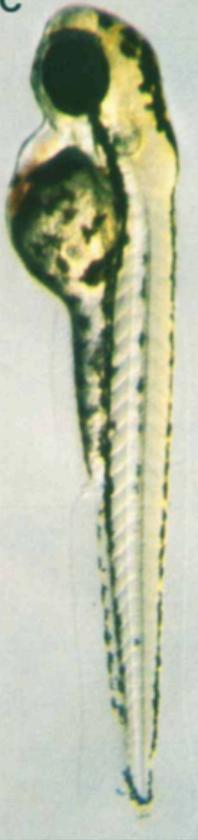


Figura 8. Sexto periodo del desarrollo embrionario de *Danio rerio* (Kimmel et al, 1995).

A) El cerebro está prominentemente esculpido, la melanogénesis ha comenzado; B) Los melanóforos se extienden desde el nivel del cerebro posterior hasta aproximadamente la mitad del vitelio; C) células pigmentarias están presentes a lo largo del eje dorsal a la extensión del vitelio; D) El pigmento se extiende casi hasta el final de la cola; E) - F) El pigmento ahora se extiende por todo el embrión, las rayas del cuerpo del pigmento dorsal y ventral se rellenan.

<p>Eclosión</p>	<ul style="list-style-type: none"> - A partir de las 48 hpf hasta el estadio larval temprano - Se caracteriza por la eclosión los individuos eclosionan esporádicamente durante el tercer día completo de desarrollo, aunque no eclosione el embrión su desarrollo progresa hora a hora - Generalmente los individuos que han eclosionado espontáneamente no están más avanzados en el desarrollo que los que permanecen en sus coriones - El embrión continúa creciendo aproximadamente al mismo ritmo que antes - La morfogénesis de muchos de los rudimentos de los órganos ahora es bastante completa y se ralentiza considerablemente, con algunas excepciones notables que incluyen el intestino y sus órganos asociados - El ojo toma forma de ojo de pez (bordes brillosos y se pierde la completa pigmentación de estos) - Las aletas pélvicas y pectorales inician su desarrollo - La mandíbula mueve la posición de la boca hacia adelante 	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>A)</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>B)</p>  </div> </div>
------------------------	---	---

		<p>C) D)</p>  <p>Figura 9. Séptimo periodo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> (Kimmel et al, 1995).</p> <p>A) Inicia etapa de eclosión, la cabeza aun esta curvada; B) La cabeza comienza a enderezarse, disminuye el vitelio y los ojos comienzan a perder pigmentación; C) Comienza a formarse la boca, la mandíbula está ligeramente desplazada hacia adelante; D) Se han formado las aletas pectorales, los bordes de los ojos han perdido pigmentación y son más brillantes .</p>
--	--	--

Antecedentes

Efluentes hospitalarios en el mundo

La composición de los efluentes hospitalarios es muy variada no solamente entre las especialidades de cada clínica, sino también entre los centros de tratamiento y por supuesto también en las diferentes zonas geográficas y los países donde se realice el monitoreo de los mismos; sin embargo, es importante tomar en cuenta todos los estudios para reunir esfuerzos con el fin de presentar propuestas para priorizar en la eliminación de compuestos basándose en la presencia a nivel mundial y los efectos adversos que pueden causar en los organismos y en el medio (Castro et al., 2015).

Oliviera et al. en 2017 registraron la presencia de fármacos de 12 categorías en tres regiones alrededor del mundo (Asia, Europa y Norte América) en un rango que va desde los 78µg/L hasta los 5000µg/L. Debido a que en este estudio se pone especial énfasis en la detección de fármacos en el efluente hospitalario de la planta de tratamiento del Hospital Ángeles, se deben considerar las investigaciones previas en las que se han detectado fármacos en efluentes hospitalarios alrededor del mundo, algunas de las cuales son:

En España se han reportado fármacos como: amoxicilina, ácido acetil-salicílico, enalapril, algunos beta bloqueantes, metronidazol, ranitidina, codeína, trimetoprima, atenolol, eritromicina, paroxetina, propranolol, carbamazepina, fluoxentina, ketorolaco, paracetamol, ibuprofeno, diclofenaco, ácido mefenámico e indometacina en efluente hospitalario (León, 2015; Daouk et al., 2015).

Por otro lado, en Noruega se han encontrado paracetamol, metoprolol, diclofenaco, ibuprofeno, 17-beta-estradiol, estriol, estrona, trimetoprima, ciprofloxacina, sulfametoxazol y tetraciclina como fármacos en efluente hospitalario igualmente (León, 2015).

En Francia se han detectado fármacos como: antifúngicos (clotrimazol), antipsicóticos (sulpirida, clorpromazina), hormonas (17alfa-etinilestradiol, 17-beta-estradiol, estrona, progesterona), antibióticos (ampicilina, norfloxacina, ofloxacina, tetraciclinas, fluoroquinolonas), anticancerígenos (5-fluorouracilo), antiinflamatorios no esteroideos (diclofenaco, ácido acetilsalicílico, paracetamol, naproxeno, ibuprofeno), beta bloqueantes (propranolol y atenolol) barbitúricos (fenobarbital), benzodiazepinas (lorazepam), antiepilépticos (carbamacepina), antihistamínicos (ranitidina, loratadina), entre otros (Orias y Perrodin 2014).

En Portugal se han reportado fármacos como analgésicos y antiinflamatorios (ketoprofeno, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, oxicodona, paracetamol), reguladores de lípidos (bezafibrato, gemfibrozil), psiquiátricos (carbamazepina, fluoxetina, norfluoxetine, paroxetina, diazepam, lorazepam, alprazolam), antihistamínicos (loratadina, desloratadina, ranitidina), beta-bloqueadores (atenolol, propranolol, metoprolol), diuréticos (furosemida, torasemida), antidiabéticos (metformina, glibenclamida), antihipertensivos (amlodipina, losartan, irbesartan, valsartan), agente antiplaquetario (lopidogrel), β -agonista (salbutamol), anticoagulante (warfarin), agente de contraste para rayos X (iopromide), antihelmínticos (albendazol, tiabendazol, levamisol), glucocorticoide (dexametasona), antibióticos (macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas), bloqueadores de canales de calcio (diltiazem, verapamil, norverapamil) (Santos et al., 2013).

Continuando con países Europeos en Italia se han reportado los siguientes grupos de fármacos: antiinflamatorios no esteroideos (paracetamol, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno), antibióticos (tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrólidos, sulfamidas), anti-diabéticos (glibenclamida), anti-hipertensivos, barbitúricos, beta-agonistas, beta-bloqueadores, diuréticos (furosemida), reguladores de lípidos, psiquiátricos, antagonistas de los receptores y antineoplásicos (tamoxifeno) (Verlicchi, Al Aukidy, Galletti, Petrovic, y Barceló, 2012).

En efluentes de Estados Unidos fueron encontrados analgésicos (paracetamol, codeína, lidocaína y morfina), antibióticos (claritromicina, eritromicina, sulfametoxazol y trimetoprima), antiepilépticos (carbamazepina, gabapentina, lamotrigina, fenobarbital), antihistamínicos (loratadina), antiinflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno), antitrombótico (ácido copidogrel carboxílico), bloqueador de los canales de calcio (diltiazem), desinfectante (triclosán), diurético (furosemida), agentes modificadores de los lípidos (atorvastatina, gemfibrozilo), fármaco para enfermedad obstructiva de las vías respiratorias (clenbuterol), psicoanalépticos (cafeína, fluoxetina y sertralina), psicolépticos (alprazolam y diazepam), antagonista del receptor (ranitidina) y β -bloqueantes (metoprolol y propanolol) (Oliveira et al., 2015).

Efluentes hospitalarios en México

En México los efluentes hospitalarios llegan a alcanzar concentraciones de fármacos en un rango de 0.018 hasta los 4.01 $\mu\text{g/L}$, entre los cuales se encuentran AINE's, antidiabéticos, β -lactámicos, β -bloqueantes y hormonas los cuales se encuentran (Luja et al., 2019). Lo anterior es debido a las prácticas de disposición de desechos y a que las instituciones carecen de plantas de tratamiento, (Quesada, Jáuregui, Wilhelm y Delmas, 2009) representando estos efluentes una fuente de exposición crónica a fármacos que se vierten en el drenaje y en las plantas de tratamiento en el mejor de los casos, o bien directamente en aguas superficiales y subterráneas pudiendo generar serios problemas ambientales (Barceló, 2003).

Los siguientes casos brindan información acerca de los fármacos comúnmente encontrados en efluentes hospitalarios del centro del país. En Toluca, se ha reportado la presencia de los siguientes fármacos: glibenclamida, metformina, atenolol, metoprolol, penicillina-G, penicillina-V, 17-beta-estradiol, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y paracetamol (Pérez et al., 2001). En efluentes hospitalarios de la Ciudad de México se han encontrado los siguientes fármacos: paracetamol,

ácido acetil-salicílico, naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno, trimetoprima, ofloxacino, ciprofloxacino, sulfametoxazol, carbamazepina, bisfenol A, beta-estradiol y triclosan (Calderón, Meraz, y Tomasini, 2019).

Estudios toxicológicos

Los primeros estudios toxicológicos con *D. rerio* se tienen en 1998 con Dietrich, donde se usó como bioindicador para evaluar el daño embriotóxico y teratogénico; así como el daño en el corazón inducido por muestras de agua. Nagel en 2002 realizó pruebas de embriotoxicidad para evaluar el efecto letal, subletal y teratogénico de 34 compuestos, en ese estudio se expusieron embriones de pez cebra durante todo su desarrollo embrionario a diferentes concentraciones de distintos compuestos, encontró que a las 48 horas presentaban ya algún daño como anomalías en el corazón, ojos, cabeza, aleta caudal, pigmentación y circulación sanguínea.

En 2013 se realizaron estudios también en aguas residuales de tipo industrial, las cuales se vierten el río Atoyac, que está ubicado en la zona industrial Puebla-Tlaxcala, en México. Las muestras causaron algún tipo de malformación en todas las diluciones (0.2, 1.0, 2.0, 4.0 y 10.0 %) entre las 24-72 hpf, registrando algunos embriones más de cinco malformaciones en un mismo organismo (Solis, 2013). Los valores de la CL_{50} fueron desde 0.62 hasta 11.31 de porcentaje de la muestra dependiendo del sitio de recolección de la misma (Solis, 2013).

En un estudio de 2015 en Cuenca, Ecuador, se realizó la caracterización del agua residual de un Hospital de esa misma ciudad, en ese país si existe una normatividad para este tipo de residuos. Con las muestras obtenidas del efluente se realizaron ensayos toxicológicos con organismos acuáticos, presentando *Daphnia magna* una CL_{50} de entre 11 a 15.99 (% dilución de la muestra) y *Danio rerio* con una CL_{50} de 60.67 a 83.48 (% dilución de la muestra) (León, 2015).

En México se han realizado estudios con organismos acuáticos de embriotoxicidad y teratogenicidad como consecuencia de la exposición a efluente hospitalario. En 2018 Pérez-Álvarez reportó que efluente hospitalario de Toluca, México presentó un índice teratogénico de 3.8 para *X. laevis* y de 4.0 para *L. catenbeianus*, lo cual indica que el efluente es teratogénico, ya que el resultado es >1 lo que indica que produce efectos teratogénicos (Luja et al., 2019). En ambas especies; también en el mismo estudio se presentó una inhibición en el crecimiento, así como diversas malformaciones como microcefalia, edema facial y pericárdico, malformaciones de ojo, cola y aleta (Pérez et al., 2001). Luja-Mondragón en 2019 reportó embrioletalidad (5.65%) y efectos teratogénicos (3.85%) en *Cyprinus carpio* debido a la exposición a diferentes proporciones de efluente hospitalario de la clínica 221 del IMSS en Toluca, Estado de México (Luja et al., 2019).

En cuanto a estudios relacionados con efectos letales y teratogénicos en *Danio rerio* con algunos de los fármacos analizados en este trabajo se tienen los siguientes. Un estudio de Horie et al. en 2018, en el que se expusieron embriones de *Danio rerio* a diclofenaco sódico (0.4-7.0mg/L), reporta la presencia de edema pericárdico, curvatura corporal y letalidad de los mismos organismos la semana siguiente a la eclosión. Embriones de *Danio rerio* incubados con dexametasona presentaron eclosión tardía y actividad de natación deteriorada, así como retraso del desarrollo (Wilson et al 2013). En el caso de fármacos AINE's ibuprofeno y el paracetamol han reportado una CE_{50} de 18.01 mg/L y de 1824.74 mg/L respectivamente (Lomba, et al., 2019). La presencia de cortisol (hidrocortisona) en el medio es capaz de causar deformidades cardíacas, como edema pericárdico y cámaras malformadas, así como disminución del latido cardíaco en etapas tempranas del desarrollo en *Danio rerio* (Nesan y Vijayan, 2012). Se ha reportado al naproxeno como inhibidor de la eclosión, causante de frecuencia cardíaca baja y de anomalías morfológicas, así como edema pericárdico (Li et al, 2016). El diclofenaco se reportó por Zhang et al. en 2019 como inhibidor de las contracciones musculares espontáneas y también como capaz de disminuir la tasa de eclosión.

Justificación

Los hospitales consumen una gran cantidad de agua, en consecuencia también generan grandes cantidades de aguas residuales, las cuales contienen una gran variedad de contaminantes que usualmente no son eliminados en su totalidad en la plantas tratadoras de agua, por lo que se introducen a los ambientes acuáticos. Una vez en el ambiente, los compuestos, en interacción con otros y con factores abióticos, causan efectos negativos en los organismos como lesiones genéticas, daño a órganos, a tejidos, cambios en el comportamiento, alteraciones bioquímicas y estrés oxidativo, si estos efectos se presentan durante el desarrollo embrionario generan embriotoxicidad y teratogenicidad, manifestándose con la muerte de los organismos y con malformaciones en los mismos; los cuales son de los efectos más evidentes ante la exposición a sustancias tóxicas. En este sentido la presencia de malformaciones o de alteraciones fisiológicas en embriones expuestos es un indicador de referencia para una futura normatividad enfocada en el adecuado tratamiento de efluentes hospitalarios. Por otro lado, *Danio rerio* como modelo animal ha tomado fuerza en la determinación de sustancias con potencial embriotóxico y teratogénico, principalmente porque estas sustancias afectan etapas del desarrollo comunes en todos los vertebrados. Es por todo lo anterior que, en nuestro país, se requiere de estudios que lleven a la creación de una legislación para el tratamiento adecuado de este tipo mezclas antes de ser desahogadas en el efluente municipal o los cuerpos de agua.

Hipótesis o pregunta de investigación

La exposición al influente y efluente del Hospital Ángeles causará efectos teratogénicos y alteraciones en el desarrollo embrionario en *Danio rerio*.

Los organismos expuestos al agua tratada (efluente) presentarán menor mortalidad y menor presencia de malformaciones que los expuestos al agua no tratada (influyente).

Objetivos

General

→ Evaluar la embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por el influente y efluente de la planta de tratamiento de agua del Hospital Ángeles sobre el bioindicador *Danio rerio*.

Particulares

- Evaluar los efectos al desarrollo embrionario de *Danio rerio* producido por la exposición al influente y efluente hospitalario.
- Determinar el índice teratogénico (CL_{50}/CE_{50}) tanto del influente como del efluente hospitalario en *Danio rerio*.
- Identificar y cuantificar las malformaciones del desarrollo inducidas por exposición al influente y efluente hospitalario en *Danio rerio*.

Método

Muestras de agua

Obtención de las muestras de influente y efluente hospitalario

El hospital en estudio se encuentra en la ciudad de Puebla, México. Es un hospital de especialidades, cuenta con 10 quirófanos, camas de terapia intensiva e intermedia, área de neonatología con cunas fisiológicas, cubículos de terapia intensiva neonatal, cuidados intermedios, de aislamiento, de crecimiento y desarrollo, área de maternidad, cuenta con 300 Médicos especialistas, 46 especialidades y subespecialidades (Hospitales Ángeles, 2019).

Las muestras se obtuvieron diariamente del 11 marzo al 15 de marzo de 2019, tanto del influente de la planta de tratamiento del hospital como del efluente de la misma. Este procedimiento se realizó de acuerdo con lo estipulado en la norma NOM-002-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de

contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano y municipal. El muestreo se realizó manualmente utilizando recipientes de 500 ml cubiertos de la luz.

Caracterización del influente y efluente hospitalario

La determinación de los parámetros del agua se llevó a cabo de acuerdo a las normas correspondientes: La Demanda Bioquímica de Oxígeno de acuerdo a la NMX-AA-028-SCFI-2001; la Demanda Química de Oxígeno con NMX-AA-030/1-SCFI-2012; conductividad electrolítica NMX-AA-093-SCFI-2000; pH NMX-AA-008-SCFI-2016; temperatura NMX-AA-007-SCFI-2013; plomo NMX-AA-051-SCFI-2016; el oxígeno disuelto se determinó de manera directa, usando un medidor de oxígeno disuelto en agua (oxímetro).

Las concentraciones de los fármacos (dexametasona, esomeprazol, hidrocortisona, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno, omeprazol, paracetamol, ranitidina) fueron determinadas mediante LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas), el cromatógrafo fue un equipo Waters, Mildford, MA; la columna usada fue Acquity UPLC BEH C18 (2.1 X 100 mm, 1.7 μ m) y el espectrómetro de masas fue Quattro Premier XE triple cuadrupolo equipado con ionización por electropulverización.

Después de la caracterización de las muestras, estas fueron transportadas al laboratorio de Toxicología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, donde fueron almacenadas desde marzo de 2019 a temperatura ambiente y protegidas de la luz hasta el mes de julio de 2019, cuando se realizó el ensayo toxicológico.

Estudio de embriotoxicidad y teratogenicidad

Este estudio está basado en la Guía de la OCDE para la prueba de productos químicos 236: Prueba de toxicidad aguda en embriones de pez.

Mantenimiento de los progenitores

Para la producción de huevos se utilizaron peces reproductores de tipo salvaje, los cuales fueron adquiridos comercialmente, se seleccionaron aquellos con madurez sexual, de entre 4 y 5 cm de longitud, libres de síntomas de infección y enfermedad.

En primera instancia se determinaron las condiciones necesarias para mantener a los progenitores y asegurar la reproducción, así como para conocer con certeza la tasa de fertilización de este grupo. Los peces reproductores se mantuvieron en acuarios con una capacidad de carga recomendada de 1L de agua por pez, separados machos de hembras, con un fotoperíodo natural y a una temperatura de 27°C. Se alimentaron con alimento en hojuelas comercial hasta una semana antes del desove, cuando se cambió este alimento por *Artemia sp.*, la cual es una dieta rica en proteínas, carbohidratos, lípidos y fibra, por lo que favorece la producción de ovocitos. Se realizó limpieza y recambio de agua del acuario cada tres días (OECD, 2013).

Producción de ovocitos y fecundación

Los huevos de pez cebra se produjeron en tanques de desove individuales, en los cuales se colocaron los grupos de desove: hembras y machos (previamente sexados y aislados) en una proporción de 5: 3 respectivamente. El tanque de desove se colocó unas horas antes del inicio de la oscuridad el día anterior a la prueba (a las 17 horas del día), cada uno con 10L agua corriente con sales marinas (en la proporción indicada por el fabricante) y anticloro, con un termostato a temperatura de 27°C; se usaron tres tanques de desove para realizar el ensayo.

Para poder recolectar los huevos fertilizados y evitar la depredación de los mismos por parte de los adultos se formó una barrera entre los organismos progenitores y los huevos, esta barrera consistió en formar trampas con cajas de malla de 0.5 cm de poro dentro de los tanques.

El apareamiento, el desove y la fertilización tienen lugar dentro de los 30 minutos posteriores al inicio de la luz y las trampas de desove se eliminaron cuidadosamente para recolectar los huevos por medio de succión, después se enjuagaron con solución fisiológica después de la recolección (OECD, 2013). En seguida fueron observados en un microscopio estereoscópico a 4X y se separaron los viables de los no viables, los cuales se desecharon, se usaron únicamente como viables aquellos embriones que estaban fertilizados y no coagulados tal como se pueden diferenciar en la **Fig.10**. Para evitar el sesgo genético, los huevos se recolectaron de los tres grupos de reproducción, fueron mezclados y seleccionados al azar (OECD, 2013).

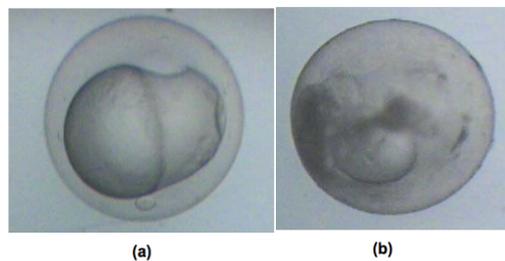


Figura 10. Viabilidad de embrión de *Danio rerio*.

a) Embrión viable de *Danio rerio* y b) embrión no viable (Peña, 2008).

Estandarización de condiciones de mantenimiento para los embriones

Previo a la exposición de los embriones a las diluciones del influente y efluente se realizaron pruebas para establecer las condiciones de mantenimiento de los embriones para garantizar su viabilidad y supervivencia. Mediante estas pruebas se determinó que la mayor supervivencia de los embriones y las larvas de *Danio rerio* se presentó usando el medio preparado con sales marinas en una concentración de

90mg por litro de agua corriente y con una gota de anticloro por litro, este medio estaba previamente aireado durante 48 horas anteriores a la colocación de los organismos en placas de 24 pozos de fondo plano, cada uno de los pozos conteniendo 2ml del medio y solo un embrión. Así como la temperatura óptima se encontró a los $27^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Determinación de las diluciones de exposición

Al tratarse de muestras únicas no se tenía conocimiento de su toxicidad, por lo que se llevaron a cabo pruebas preliminares, en las que se prepararon seis concentraciones sin replicas, las cuales fueron las siguientes: 0.1, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 %, diluidas en medio (agua corriente, 90mg/L de sales marinas y una gota de anticloro por litro de agua) . Los embriones fueron expuestos a estas proporciones de ambas muestras en las condiciones establecidas previamente en la estandarización. De esta exposición se obtuvo que en las proporciones de 4.0% y 5.0% hubo una supervivencia nula, tanto en las muestras de efluente como de influente, por lo que se reajustaron las proporciones de exposición a las siguientes: para influente 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.3, 3.5 %; para efluente 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.3, 2.5, 3.0, 3.5 %.

Exposición al tóxico

Una vez que se identificaron los embriones viables se usaron para exponerse al agente tóxico. La prueba se inició a las 4 horas después de la fertilización, cuando los organismos se encontraban en el estadio de domo como se muestra en la **Fig. 11**. y finalizó después de 96 horas de exposición (OECD, 2013).

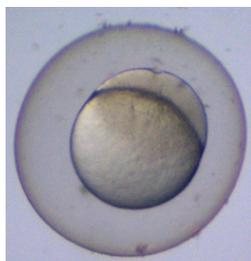


Figura 11. Embriones en estadio de domo a las 4 hpf

Se usaron 60 embriones por proporción, los cuales se colocaron en placas de 24 pozos (un embrión por pozo) para la exposición al influente y efluente de la planta de tratamiento del Hospital Ángeles de Puebla. En cada pozo se colocaron 2ml del medio estandarizado, para el grupo control y el medio con las respectivas proporciones de influente y efluente para los organismos expuestos; el medio estaba previamente aireado y no se cambió a lo largo del ensayo. Sólo se aceptaron los datos cuando las placas control no excedieron con más del 10% el número de embriones muertos (OECD, 2013).

Embrioletalidad

Determinación de la CL₅₀

La CL₅₀ tanto del influente como del efluente se determinó mediante la cuantificación de los embriones coagulados, es decir, embriones muertos de color blanco opaco que se observan oscuros al microscopio (Zhu et al., 2018) **Fig. 12.** y de los embriones sin latidos de corazón, los cuales se identificaron al observar en cada uno de los tiempos de corte (12, 24, 48, 72, y 96 hpf) todas las muestras en un microscopio estereoscópico, los organismos considerados muertos eran aquellos que no presentaban movimiento ni presencia de latido de corazón. A las 96 hpf se cuantificó el total de los embriones coagulados (son de color blanco lechoso y aparecen oscuros bajo el microscopio) o muertos. Con los datos obtenidos se realizó el cálculo de CL₅₀, mediante el análisis estadístico Probit en el software SPSS, con un límite de confianza al 95%.

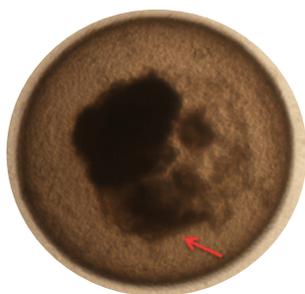


Figura 12. Embrión de *Danio rerio* coagulado (Zhu et al., 2018).

Determinación de la CE₅₀ de malformaciones

La concentración efectiva media de cada una de las muestras se determinó mediante el análisis Probit igualmente, con un límite de confianza del 95%, en el software SPSS con los datos obtenidos al observar y cuantificar la presencia de malformaciones en cada uno de los organismos, tanto expuestos a cada una de las proporciones del influente y efluente, como los no expuestos, el total de organismos con malformaciones se obtuvo al final del ensayo, a las 96 hpf.

Cálculo del índice teratogénico (IT)

El índice teratogénico se determinó a través del cociente de CL₅₀ entre CE_{50malformaciones}, estableciendo al influente y efluente como agentes teratogénicos si el resultado del cociente es un número >1; de lo contrario, si arroja un número <1, la sustancia produce principalmente efectos letales en el embrión (Luja et al., 2019).

Evaluación del desarrollo embrionario

La evaluación morfológica de los embriones se realizó en los distintos tiempos de corte a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf, para ello se utilizó un microscopio estereoscópico. Antes de observar cada uno de los organismos se agitaban los pozos de la placa

en forma circular para reactivar el movimiento en los embriones, así como para posicionarlos en el centro del pozo y facilitar su observación y la toma de fotografías.

Se revisaron cada uno de los organismos al microscopio estereoscópico a 4X, a la par de la observación se realizaba la evaluación del desarrollo en cada uno de los puntos finales de desarrollo basándonos en el estudio de Hermsen et al., 2011 (**Anexo 1**) y en la escala modificada por Luja et al., 2019 (**Anexo 2**); esta evaluación se realizaba en cada organismos al compararlo con el embrión de referencia, de acuerdo con Kimmel et al., 1995; cada embrión recibió una puntuación por cada uno de los factores a evaluar, los cuales son los siguientes: desarrollo de la cola, desarrollo ocular, formación de somitas, movimiento, latido de corazón, circulación sanguínea, pigmentación cabeza-cuerpo, pigmentación de la cola, aparición de aleta pectoral, protuberancia bucal y eclosión; por cada anomalía o retraso presentado en alguna de las características a evaluar se restó una unidad en la puntuación (Hermsen et al., 2011).

Evaluación de malformaciones y efectos teratogénico

El conteo de las malformaciones y los efectos teratogénicos se registró como presentes o ausentes y se hizo a la par de la observación y evaluación en cada tiempo de corte (12, 24, 48, 72, 96 hpf). Se observaron todos los organismos en busca de cualquiera de las siguientes malformaciones reportadas en pez cebra: edema pericárdico, edema del saco vitelino, edema ocular, malformación de la cabeza, malformación de otolitos, malformación de cola, malformación de corazón, estructura de cuerda modificada (escoliosis) y raquisquisis (Hermsen et al., 2011) (**Anexo 3**); se fotografiaron aquellas deformidades más representativas para su posterior descripción. La prueba se consideró válida, ya que el total de malformaciones en el grupo control no superó el 10%.

Análisis estadísticos

Para determinar si existen diferencias significativas entre los promedios del puntaje de morfología general en *Danio rerio* de Hermsen et al, 2011, de todas las concentraciones del influente y del efluente a las que fueron expuestos los organismos a los diferentes tiempos de desarrollo (12, 24, 48, 72 y 96 hpf), con respecto al grupo control, se realizó un análisis estadístico de varianza unifactorial (ANOVA), de una vía. Este análisis se realizó con el programa SPSS con un nivel de confianza del 95%.

Para comparar el número de organismos muertos en el influente con los del efluente y así determinar si el tratamiento del agua disminuye el riesgo de mortalidad para los organismos se realizó una prueba t de student en Microsoft Excel; se realizó la misma prueba para comparar el número de organismos con malformaciones en ambas muestras.

Resultados

Análisis del influente y efluente de la planta de tratamiento del Hospital Ángeles, Puebla, México

Caracterización fisicoquímica del influente y efluente

En la **Tabla 2.** y en la **Tabla 3.** se muestran los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos analizados en el influente y efluente de la planta de tratamiento, respectivamente, las normas en las que está basada la metodología para medir cada uno de los parámetros y el límite máximo permisible de acuerdo a la NOM-002-SEMARNAT-1996, la cual establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del influente de la planta de tratamiento

Característica	Resultado	Límite permisible según la NOM-002-SEMARNAT-1996
DQO	892.80 mg/L	200mg/L
DBO	442.86 mg/L	150 mg/L
Conductividad eléctrica	2099.20 μ S/cm	No aplica
pH	8	5.5-10
Temperatura	24°C	40°C
Plomo	<0.180 mg/L	1.5 mg/L
Oxígeno disuelto	6.50 mg/L	No aplica

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del efluente de la planta de tratamiento

Característica	Resultado	Límite permisible según la NOM-002-SEMARNAT-1996
DQO	$^{\circ}$ < 19.68 mg/L	200mg/L
DBO	$^{\circ}$ < 5.67 mg/L	150 mg/L
Conductividad eléctrica	1141.2 μ S/cm	No aplica
pH	6.3	5.5-10
Temperatura	22°C	40°C
Plomo	< 180 mg/L	1.5 mg/L
Oxígeno disuelto	6.5 mg/L	No aplica

$^{\circ}$ <: Menor a la cantidad mínima cuantificable

En los resultados del efluente se encuentra que después del tratamiento disminuyen efectivamente la DQO y la DBO a límites permitidos por la norma, incluso por debajo de los límites cuantificables.

Cuantificación de fármacos encontrados en el influente y el efluente

En la **Tabla 4.** y **Tabla 5.** se muestran los promedios de las concentraciones de los fármacos que fueron cuantificados en el influente y efluente respectivamente, el promedio se realizó con cinco muestras de cada uno, las cuales se realizaron en cinco días, del 11 a 15 de marzo de 2019. Sin embargo, existe la posibilidad de que se encuentren otros fármacos que no fueron cuantificados.

Tabla 4. Concentraciones promedio de fármacos presentes en el influente

Fármaco	Promedio de la concentración (ng/L)
Dexametasona	55.03
Hidrocortisona	82.35
Paracetamol	38,740.11
Ibuprofeno	249.46
Ketorolaco	976.42
Naproxeno	6,321.42
Omeprazol	35.50
Esomeprazol	35.98
Ranitidina	17.45

En el influente se encontraron altas concentraciones de fármacos, particularmente de los clasificados como antiinflamatorios no esteroideos. Sin embargo, los valores no pueden compararse con límites de referencia en alguna norma, ya que no existe una legislación que regule presencia de fármacos en aguas de residuo en México.

En el efluente la concentración de fármacos disminuyó con respecto al influente para todos los fármacos, muchos incluso disminuyeron por debajo del límite de cuantificación del equipo, el cual es de 10 ng/L.

Tabla 5. Concentraciones promedio de fármacos presentes en el efluente

Fármaco	Promedio de la concentración (ng/L)
Dexametasona	< 10
Hidrocortisona	14.4
Paracetamol	52
Ibuprofeno	< 10
Ketorolaco	373.8
Naproxeno	< 10
Omeprazol	12.6
Esomeprazol	12.6
Ranitidina	<10

Estudio toxicológico

Datos de embrioletalidad y teratogenicidad

En la **Tabla 6.** y la **Tabla 7.** se muestran el número de organismos muertos, el número de malformados, los datos de porcentajes de mortalidad y los porcentajes de malformaciones que se presentaron a las diferentes proporciones del influente y efluente respectivamente. Estos datos se emplearon para calcular la CL_{50} y la $CE_{50malformaciones}$ para ambas muestras, mediante el análisis Probit con intervalos de confianza del 95%. La CL_{50} para el influente fue de 1.466%, mientras que para el efluente fue de 2.484%; en cuanto a la $CE_{50malformaciones}$ el resultado fue de 3.468% para el influente y de 6.096% para el efluente. La prueba t de student se realizó para comparar la mortalidad presentada en los organismos expuestos al influente con la presentada en el efluente, la prueba arrojó un valor de p de 0.041, es decir $p < 0.05$, lo cual indica que existe diferencia significativa entre el número de organismos muertos en todas las concentraciones del influente y del efluente. Para el caso de

la comparación entre el número de organismos malformados presentes en las muestras del influente con los del efluente, la prueba t de student arrojó un valor de p de 0.278, el cual es mayor a 0.05, por lo tanto, en este caso no existe una diferencia significativa entre el valor de la CE50 del influente con la del efluente.

A partir de los valores de la CL50 y la CE50 se obtuvo el índice teratogénico (IT) tanto para el influente como para el efluente. El IT del influente fue de 0.423, por lo que para este estudio se consideró como agente no teratogénico; para el efluente fue 0.407, es decir, también se considera no teratogénico.

Tabla 6. Datos embrioletalidad y teratogenia del influente

Proporción del influente (%)	Número de embriones expuestos	Número de organismos muertos	Mortalidad (%)	Número de embriones malformados	Malformados (%)
0	60	0	0	0	0
0.1	60	17	28.33	0	0
0.5	60	19	31.67	4	6.67
1.0	60	24	40.00	14	26.67
1.5	60	25	41.67	16	35.00
2.0	60	27	45.00	19	36.67
2.5	60	33	55.00	20	40.00
3.0	60	33	55.00	22	45.00
3.3	60	36	60.00	24	50.00
3.5	60	51	85.00	9	43.33

Tabla 7. Datos embrioletalidad y teratogenia del efluente

Proporción del efluente (%)	Número de embriones expuestos	Número de organismos muertos	Mortalidad (%)	Número de embriones malformados	Malformados (%)
0	60	0	0	0	0
0.1	60	14	28.33	7	0
0.5	60	17	31.67	10	6.67
1.0	60	19	40.00	10	26.67
1.5	60	25	41.67	14	35.00
2.0	60	26	45.00	18	36.67
2.3	60	29	55.00	22	40.00
2.5	60	32	55.00	22	45.00
3.0	60	34	60.00	22	50.00
3.5	60	36	85.00	24	43.33

En las **Fig. 13.** y **Fig. 14.** se muestran los datos de los embriones expuestos a las diferentes proporciones del influente y efluente respectivamente, se muestra el número de organismos que fueron normales, es decir, aquellos que presentaron un desarrollo normal con respecto a la descripción de Kimmel et al., en 1995 y que no presentaron malformaciones durante el desarrollo; también se muestran los que sí presentaron alguna alteración teratogénica y los que murieron. En el grupo control, el desarrollo de los embriones permaneció normal hasta 96 hpf y no hubo organismos muertos ni con malformaciones. Los resultados muestran una alta tasa de mortalidad para ambas muestras incluso a concentraciones bajas, así como un alto porcentaje de organismos malformados tanto en el influente como en el efluente, a pesar de que el tratamiento del agua mostró ser efectivo en la reducción de fármacos encontrados.

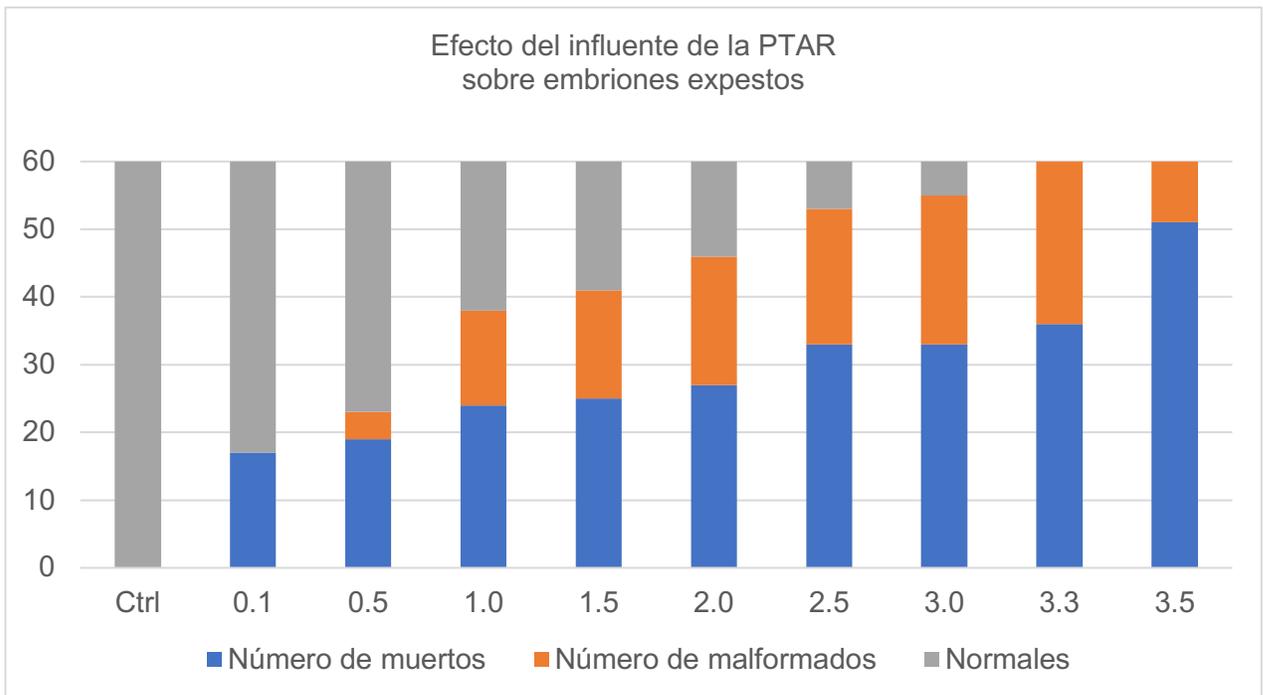


Figura 13. Embriones expuestos a diferentes concentraciones del influente.

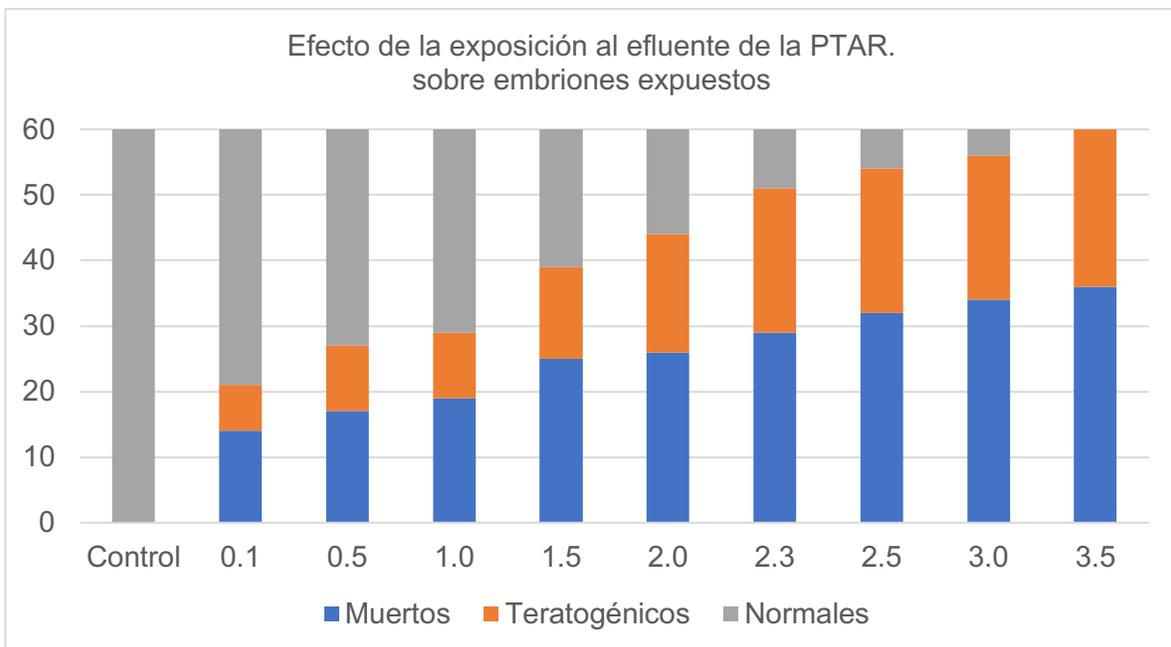


Figura 14. Embriones expuestos a diferentes concentraciones del efluente.

Principales alteraciones teratogénicas y frecuencia de las mismas por exposición al efluente hospitalario

En la **Fig. 15.**, se muestran las alteraciones teratogénicas observadas en los embriones *Danio rerio* expuestos a diferentes proporciones del influente; como se puede observar, las más frecuentes fueron: eclosión prematura, no eclosión o retraso de esta, deformación de columna, deformación de cola, edema pericárdico, malformación de saco e hipopigmentación; aunque sin duda las más frecuentes fueron las relacionadas con el proceso de eclosión, lo cual concuerda con estudios anteriores donde se reporta que este es un proceso muy susceptible al daño teratogénico.

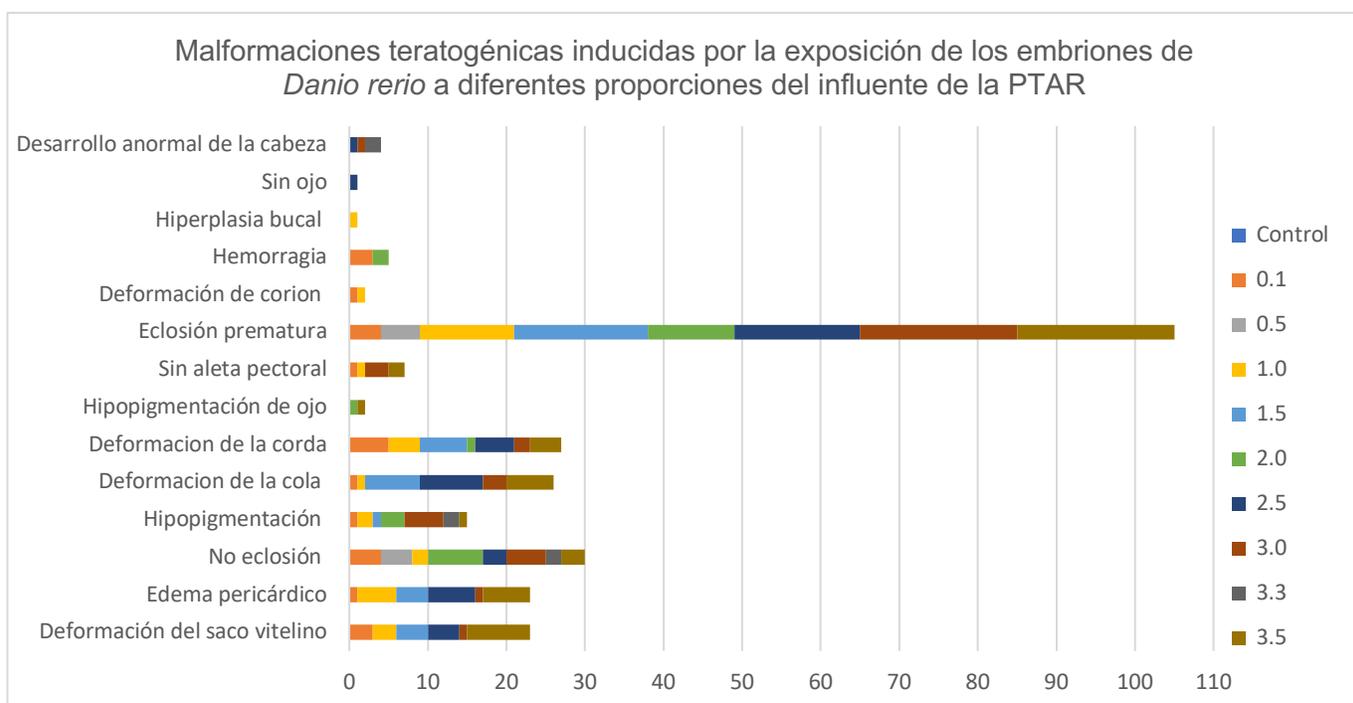


Figura 15. Frecuencia de malformaciones presentadas por la exposición al influente

Por otro lado, en la **Fig. 16.**, se muestran las alteraciones teratogénicas observadas en los organismos expuestos a diferentes proporciones del efluente; donde las más frecuentes fueron: eclosión prematura, deformación de cola, edema pericárdico,

deformación del saco vitelino, deformación de columna, no eclosión o retraso de la misma e hipopigmentación. A las mayores proporciones de influente, el número de malformaciones fue en aumento y estas se volvieron más graves, poniendo en riesgo la vida de los embriones. En este caso las malformaciones aumentaron a la par de la mortalidad con el aumento de la concentración.

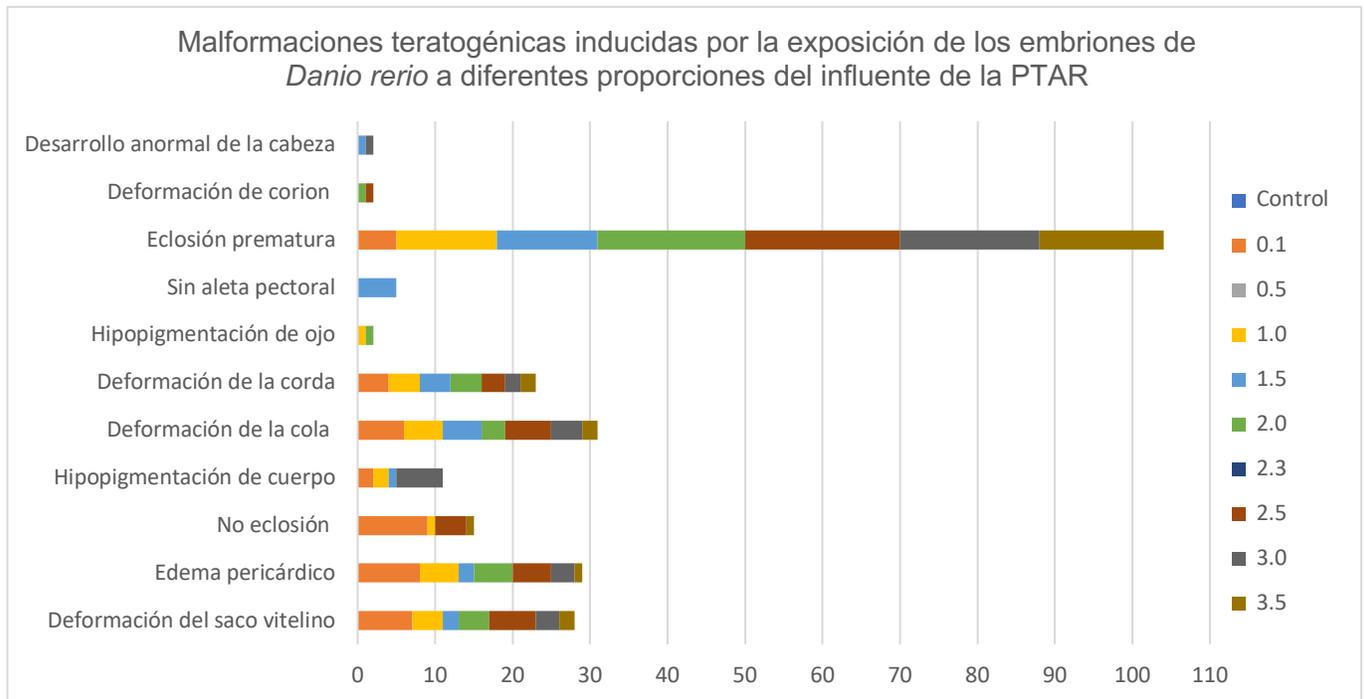
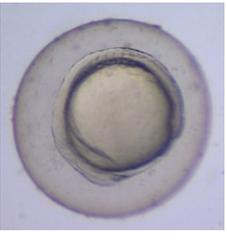
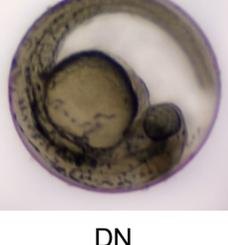
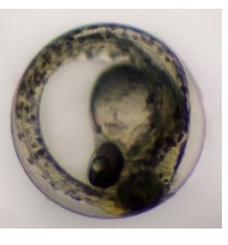
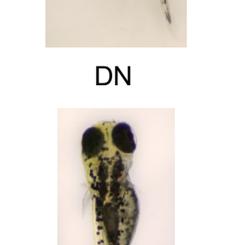
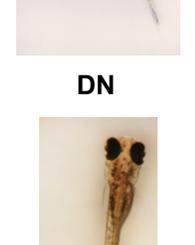
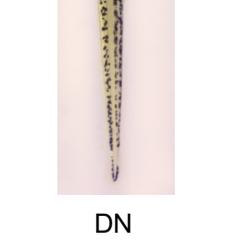


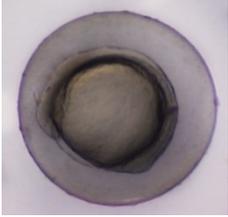
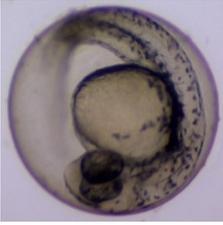
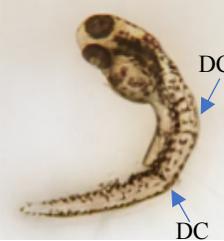
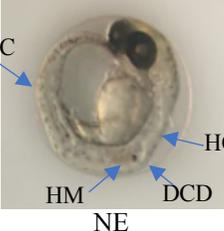
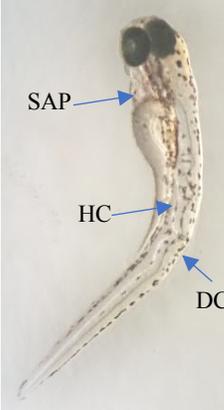
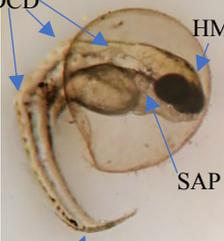
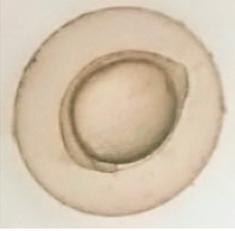
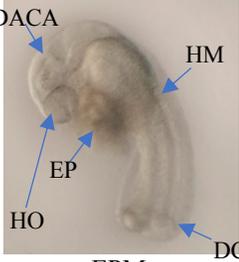
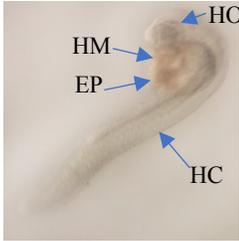
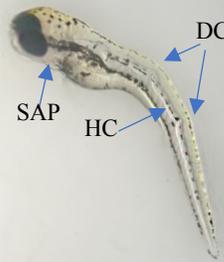
Figura 16. Frecuencia de malformaciones presentadas por la exposición al efluente

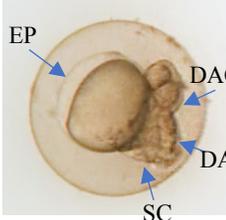
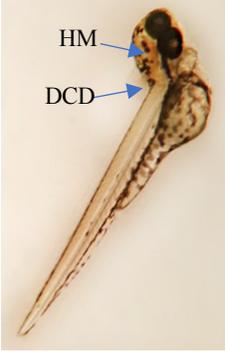
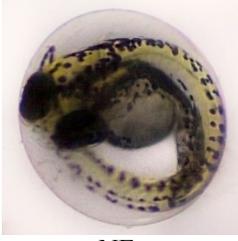
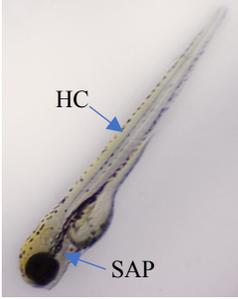
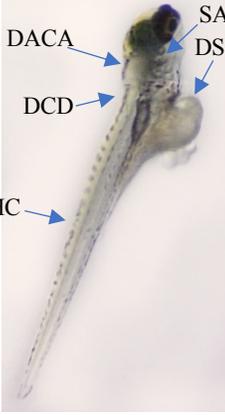
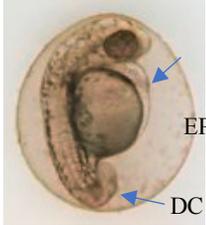
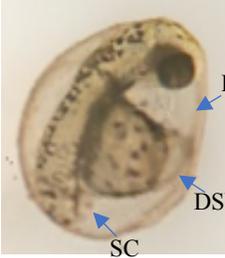
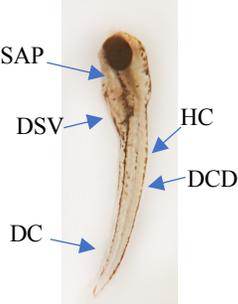
En la **Fig. 17.**, se muestran fotografías las diferentes malformaciones que aparecieron en los embriones de *Danio rerio* en cada uno de los tiempos de observación (12, 24, 48, 72 y 96 hpf) por la exposición a diferentes proporciones del influente, que fueron 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 2, 3.0, 3.3 y 3.5 %. En el grupo control, se pueden observar organismos con desarrollo normal. Se hace evidente el aumento de malformaciones con el aumento de la concentración a la que están expuestos los embriones.

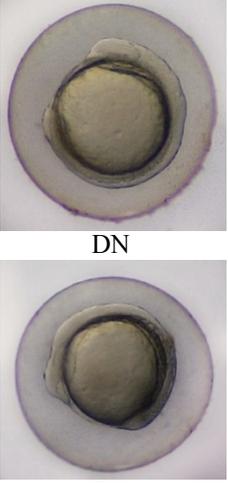
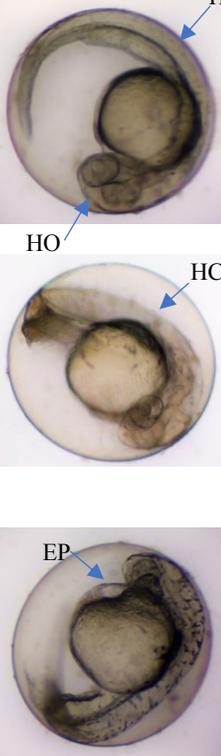
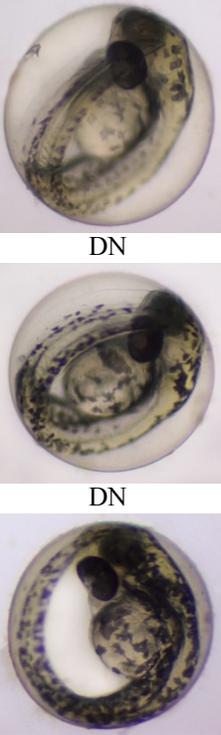
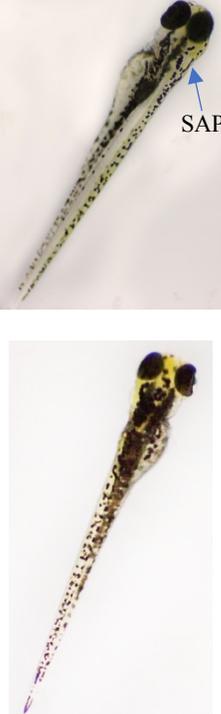
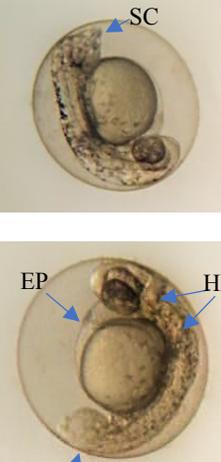
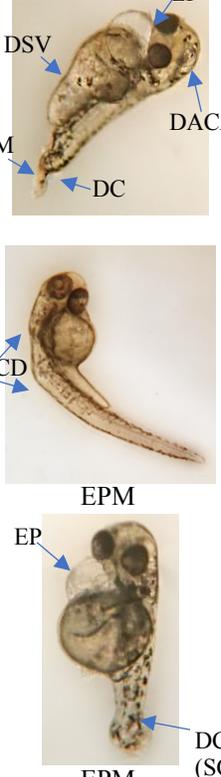
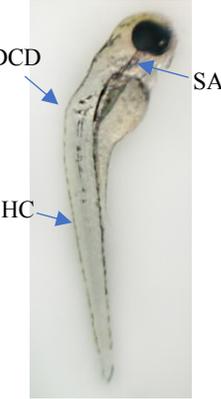
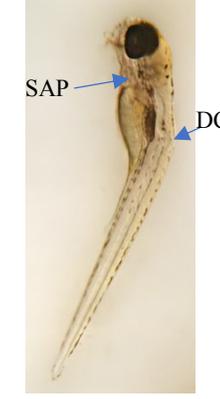
En la **Fig. 18.** se muestran fotografías de las malformaciones presentes a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf en los embriones de *Danio rerio* debido a la exposición a

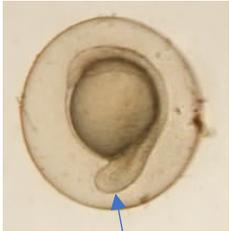
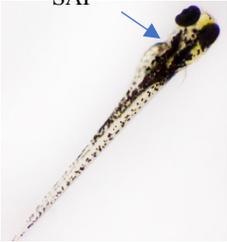
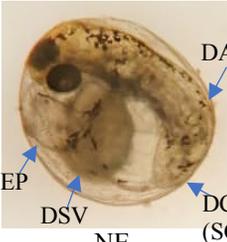
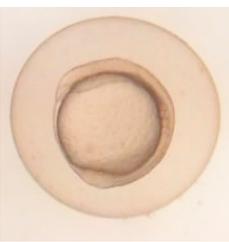
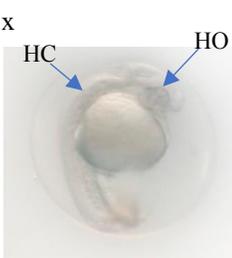
diferentes proporciones del efluente, que son 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.3, 2.5, 3.0 y 3.5 %, también en esta muestra es evidente el aumento de malformaciones con el aumento de la concentración. Igualmente se comparan con el grupo control, en el cual se pueden observar organismos con desarrollo normal.

Proporción del influente de la PTAR del hospital	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
0 %					
	DN	DN	DN	DN	DN
					
	DN	DN	DN	DN	DN
					
	DN	DN	DN	DN	DN
					
			DN	DN	DN

0.1%	 <p>DN</p>	 <p>DN</p>  <p>DN</p>  <p>DN</p>	 <p>DC</p>	 <p>NE</p>  <p>DCD</p>	 <p>DCD</p>  <p>DC</p>
0.5%	 <p>DN</p>	 <p>EPM</p>  <p>EPM</p>	 <p>EPM</p>	 <p>DCD</p>	 <p>NE</p>

<p>1.0%</p>	 <p>DN</p>	 <p>EP DACA DAC SC</p>	 <p>HM DCD</p> <p>EPM</p>	 <p>NE</p>  <p>HC SAP</p>	 <p>DACA DCD SAP DSV</p> <p>HC</p>
<p>1.5%</p>	 <p>DN</p>	 <p>DSV (ESV)</p> <p>EPM</p>  <p>EP DC</p>	 <p>EP DSV SC</p>	 <p>SAP DSV DC HC DCD</p>	 <p>NE</p>

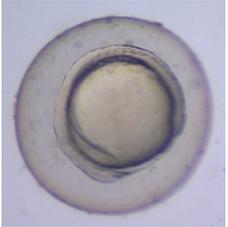
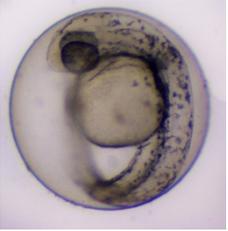
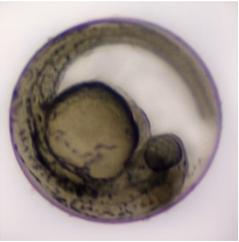
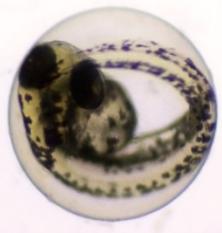
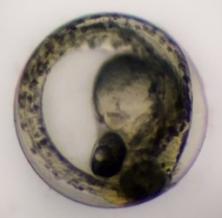
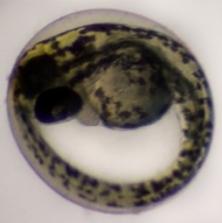
<p>2.0%</p>	 <p>DN</p> <p>DN</p>	 <p>HO</p> <p>HC</p> <p>HC</p> <p>EP</p>	 <p>DN</p> <p>DN</p> <p>DN</p>	 <p>SAP</p> <p>DN</p>	 <p>NE</p>
<p>2.5%</p>	 <p>DN</p>	 <p>SC</p> <p>EP</p> <p>HM</p> <p>DC</p>	 <p>DSV</p> <p>EP</p> <p>DACA</p> <p>HM</p> <p>DC</p> <p>DCD</p> <p>EPM</p> <p>EP</p> <p>DC (SC)</p> <p>EPM</p>	 <p>DCD</p> <p>SAP</p> <p>HC</p>	 <p>SAP</p> <p>DCD</p>

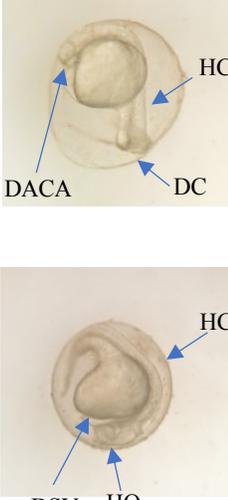
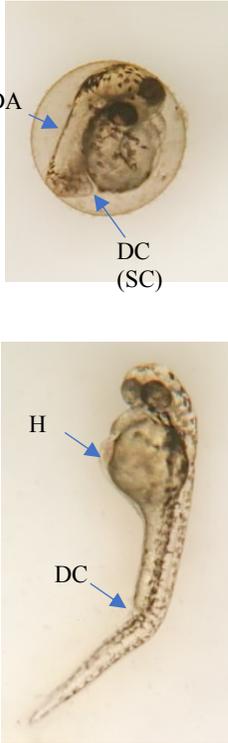
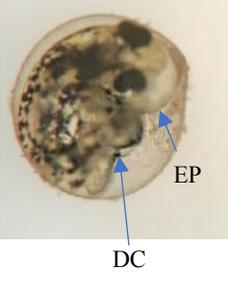
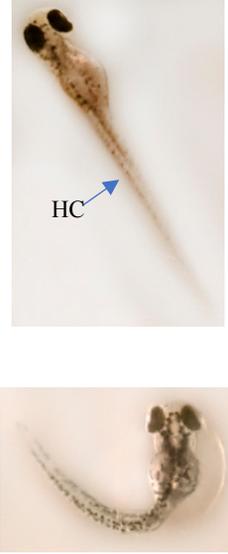
3.0%	 <p>DC</p>	 <p>DN</p>	 <p>EPM</p>	 <p>SAP</p>  <p>SAP</p>  <p>NE</p>	 <p>EP</p> <p>DSV</p> <p>NE</p> <p>DC (SC)</p> <p>DAC</p>
3.3%	 <p>DN</p>	 <p>x</p> <p>HC</p> <p>HO</p>	 <p>DN</p>	 <p>SAP</p>	 <p>DN</p>



DN = desarrollo normal; **DACA** = desarrollo anormal de la cabeza; **DC** = deformación de cola; **DSV** = deformación de saco vitelino; **EP** = edema pericárdico; **DCD** = deformidad de la corda; **E** = escoliosis; **SC** = sin cola; **DT** = desarrollo temprano; **NE** = no eclosión; **DAC** = desarrollo anormal del cuerpo; **SO** = sin ojo; **L** = lordosis; **RD** = retraso en el desarrollo; **HC** = hipopigmentación de cuerpo; **SAP** = sin aleta pectoral; **EPM** = eclosión prematura; **ESV** = edema del saco vitelino; **HM** = hemorragia; **HO** = hipopigmentación de ojo; **M** = misceláneo

Figura 17. Malformaciones presentes en embriones de *D. rerio* expuestos al influente.

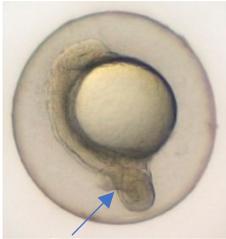
Proporción del efluente de la PTAR del hospital	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
0 %	 DN  DN  DN	 DN  DN  DN	 DN  DN  DN  DN	 DN  DN  DN	 DN  DN  DN

<p>0.1%</p>	 <p>DN</p> <p>DN</p> <p>DN</p>	 <p>DACA HC DC</p> <p>DSV HO HC</p>	 <p>DA DC (SC)</p> <p>H DC</p> <p>EPM</p>	 <p>EP DC</p> <p>EP</p>	 <p>EP SP SA</p>
<p>0.5%</p>	 <p>DN</p>		 <p>EPM</p> <p>HC</p>	 <p>HC</p> <p>DCD</p>	

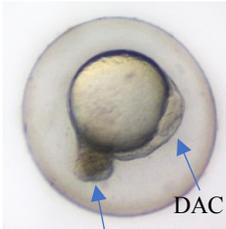
1.0%



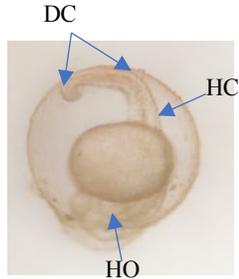
DN



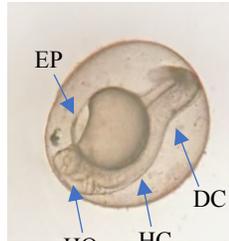
DC



DC



HO



HO

HC

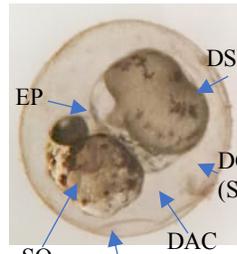
DC



DCD

DC

EPM

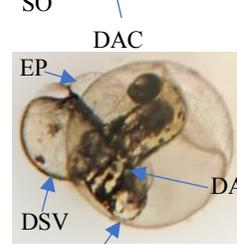


EP

DSV

DC (SC)

DAC

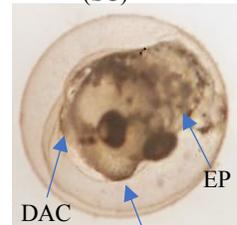


EP

DSV

DC (SC)

DAC



DAC

EP

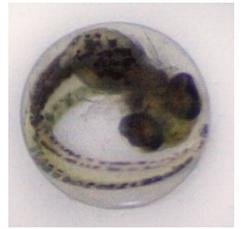
DAC



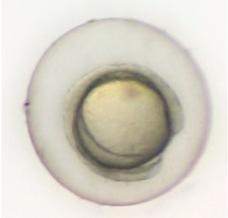
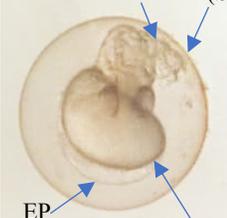
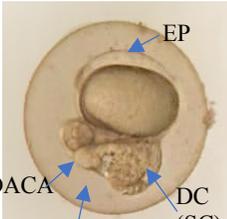
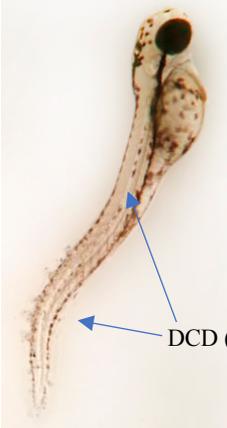
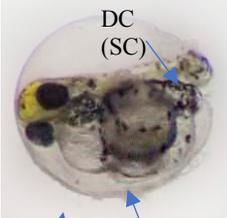
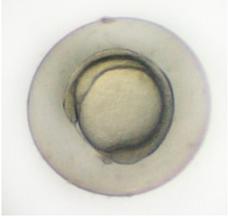
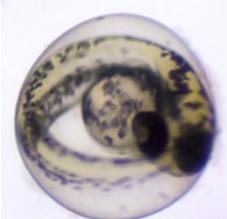
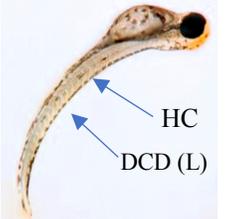
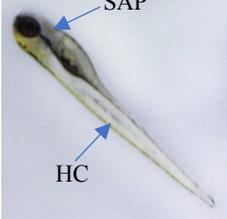
EP

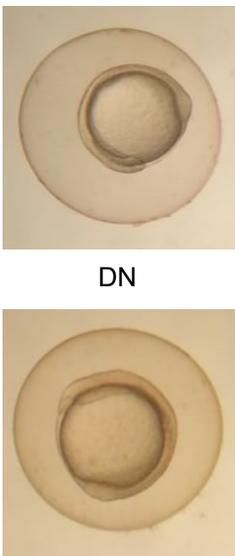
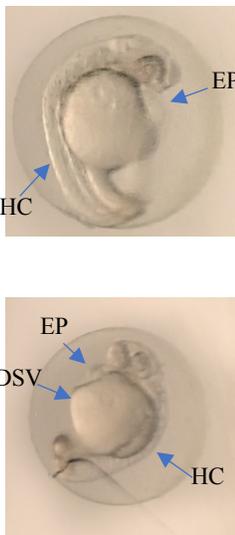
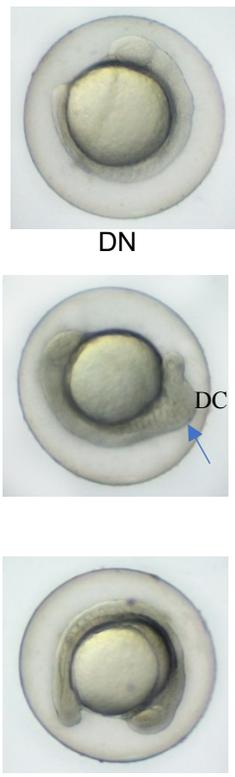
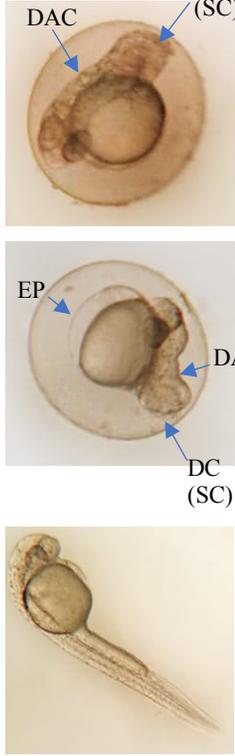
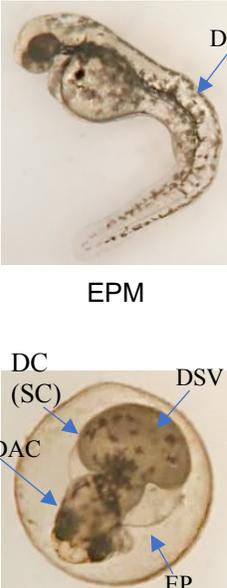
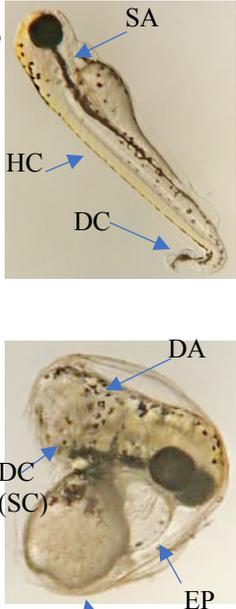
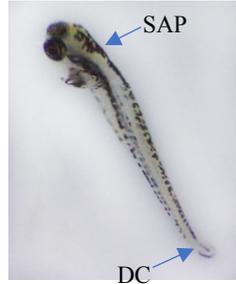
DSV

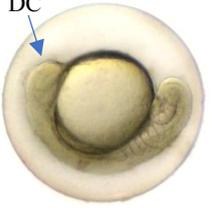
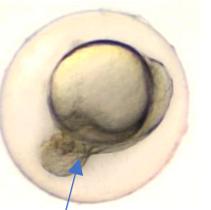
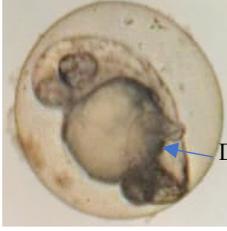
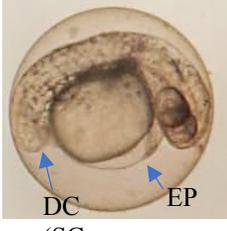
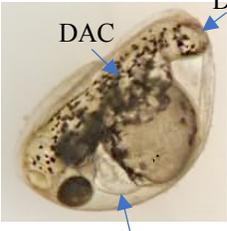
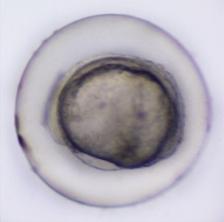
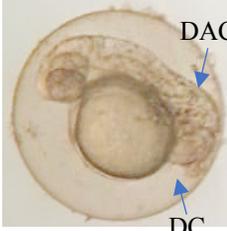
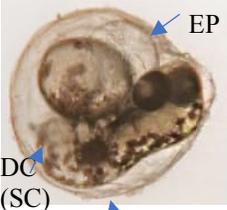
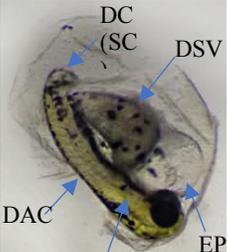
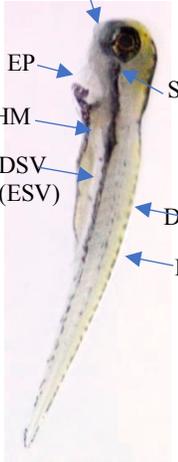
DC

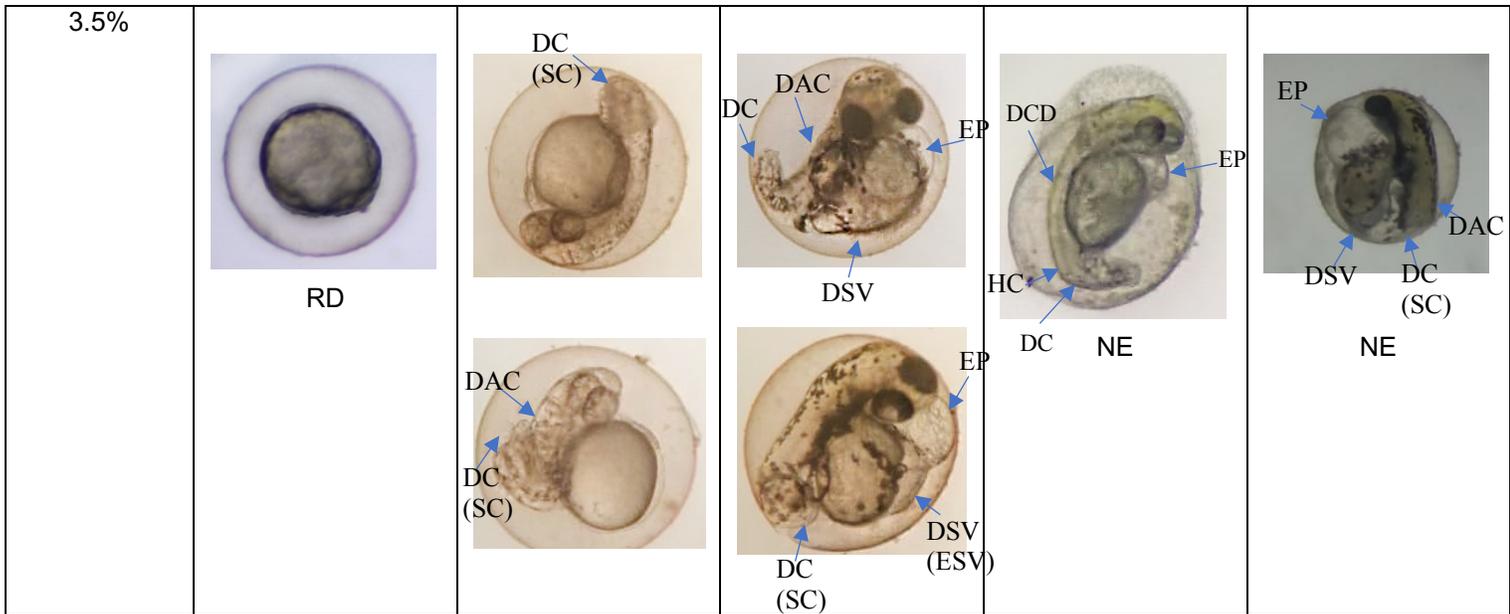


NE

1.5%	 <p>DN</p>  <p>DN</p>	 <p>DAC DC (SC) EP DSV</p>  <p>EP DACA DAC DC (SC)</p>	 <p>DCD (E)</p> <p>EPM</p>	 <p>DC (SC) EP DSV</p> <p>NE</p>	 <p>DCD</p>
2.0%	 <p>DN</p>  <p>DN</p>  <p>RD</p>	 <p>DC (SC) DSV EP</p>  <p>DC</p>	 <p>DN</p>  <p>EPM</p>	 <p>HC DCD (L)</p>  <p>HC DCD</p>	 <p>SAP HC</p>  <p>HC DCD</p>

<p>2.3%</p>	 <p>DN</p> <p>DN</p>	 <p>HC</p> <p>EP</p> <p>DSV</p> <p>HC</p>	 <p>HC</p> <p>EPM</p>	 <p>DCD</p>	
<p>2.5%</p>	 <p>DN</p> <p>DC</p> <p>DN</p>	 <p>DAC</p> <p>DC (SC)</p> <p>EP</p> <p>DAC</p> <p>DC (SC)</p> <p>DC (SC)</p> <p>EPM</p>	 <p>DCD</p> <p>EPM</p> <p>DAC</p> <p>DC (SC)</p> <p>DSV</p> <p>EP</p>	 <p>SA</p> <p>HC</p> <p>DC</p> <p>DA</p> <p>DC (SC)</p> <p>EP</p> <p>DS</p> <p>NE</p>	 <p>SAP</p> <p>DC</p>

	 <p>DN</p>  <p>DC</p>  <p>DC</p>	 <p>DC</p>  <p>DC (SC) EP</p>	 <p>EPM</p> <p>DC</p>  <p>DC (SC) EP DSV DAC M</p>  <p>DAC DC EP</p>		
3.0%	 <p>RD</p>	 <p>DAC DC (SC)</p>	 <p>EP DC (SC) DAC</p>	 <p>DC (SC) DSV DAC SAP EP</p>	 <p>SPB EP HM DSV (ESV) DC SAP HC</p>



DN = desarrollo normal; **DACA** = desarrollo anormal de la cabeza; **DC** = deformación de cola; **DSV** = deformación de saco vitelino; **EP** = edema pericárdico; **DCD** = deformidad de la corda; **E** = escoliosis; **SC** = sin cola; **NE** = no eclosión; **DAC** = desarrollo anormal del cuerpo; **SO** = sin ojo; **L** = lordosis; **RD** = retraso en el desarrollo; **HC** = hipopigmentación de cuerpo; **SAP** = sin aleta pectoral; **EPM** = eclosión prematura; **ESV** = edema del saco vitelino; **HM** = hemorragia; **HO** = hipopigmentación de ojo; **M** = misceláneo; **SPB** = sin protuberancia bucal

Figura 18. Malformaciones presentes en embriones de *D. rerio* expuestos al efluente.

Evaluación del desarrollo embrionario

La **Fig. 19.** Muestra la puntuación promedio obtenida por los organismos en cada una de las proporciones del influente, los cuales fueron evaluados en cada uno de los tiempos de corte (12, 24, 48, 72 y 96 hpf), con un error estándar de 5%. En el caso del grupo control, la puntuación obtenida fue la más alta de cada tiempo de exposición, dado que el desarrollo del embrión fue normal. Con respecto al grupo control, como se puede observar en el análisis ANOVA (**Tabla 8.**), desde las 12 hpf se encontraron diferencias significativas en los organismos expuestos a 0.5, 1.5, 2.0

y 3.3 %; a las 24 hpf se presentó diferencia en 0.1, 0.5, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.3 y 3.5; a partir de las 48 hpf se presentó diferencias en todas las concentraciones.

En la **Tabla 8.** se muestra la comparación de los promedios de puntuación morfológica general a los diferentes tiempos de desarrollo en los organismos expuestos las diferentes concentraciones del influente de la PTAR con respecto al grupo control, mediante el análisis de ANOVA, se resaltan con un asterisco (*) los que presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la puntuación obtenida en el grupo control, con un valor de $p < 0.5$.

Tabla 8. Análisis ANOVA de los promedios de puntuación morfológica de los organismos expuestos a influente.

<i>HPF/ concentración</i>	<i>0.1%</i>	<i>0.5%</i>	<i>1.0%</i>	<i>1.5%</i>	<i>2.0%</i>	<i>2.5%</i>	<i>3.0%</i>	<i>3.3%</i>	<i>3.5%</i>	<i>Control</i>
12	1.53	0.87 *	1.67	1.19 *	1.17 *	1.33	1.38	0.77 *	1.44	1.93
24	5.37 *	3.03 *	6.30	5.17 *	4.48 *	5.39 *	5.02 *	2.68 *	5.19 *	6.77
48	9.15 *	5.20 *	10.89 *	8.22 *	7.28 *	8.97 *	8.58 *	4.60 *	8.75 *	11.60
72	9.38 *	6.87 *	14.70 *	9.33 *	9.08 *	10.31 *	9.15 *	6.10 *	10.61 *	15.47
96	9.48 *	7.30 *	15.24 *	9.92 *	9.73 *	11.08 *	9.73 *	6.80 *	11.25 *	16.43

Se resaltan con * los valores que muestran diferencias significativas con respecto al grupo control, con un valor de $p < 0.5$.

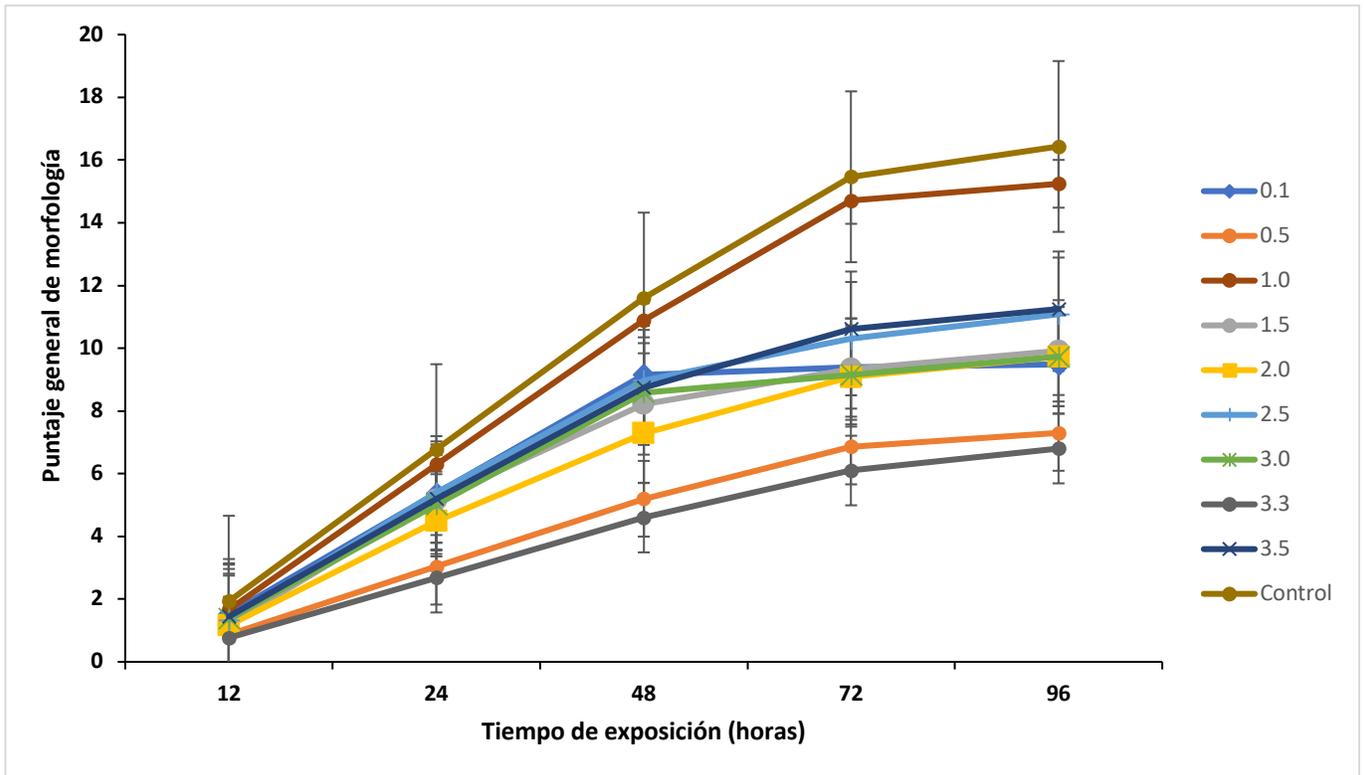


Figura 19. Promedios de puntuación morfológica en embriones expuestos al influente.

En la **Fig. 20.** se muestran los promedios de la puntuación obtenida por los organismos en cada una de las proporciones del efluente, con un error estándar de 5%. También en este caso el grupo control presentó la mayor puntuación, con respecto a los organismos expuestos. Como se puede observar en el análisis ANOVA (**Tabla 9.**), en este caso, se presentaron diferencias a las 12 hpf sólo en los grupos expuestos a 0.5, 1.5, 2.3, 3.0 y 3.5 %; después de las 24 hpf se presentaron diferencias en cada una de las concentraciones con respecto al grupo control.

En la **Tabla 9.** se muestra la comparación de los promedios de puntuación morfológica general a los diferentes tiempos de desarrollo en los organismos expuestos las diferentes concentraciones del efluente de la PTAR con respecto al grupo control, mediante el análisis de ANOVA, se resaltan con un asterisco (*) los que presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la puntuación obtenida en el grupo control, con un valor de $p < 0.5$.

Tabla 9. Análisis ANOVA de los promedios de puntuación morfológica de los organismos expuestos a efluente.

<i>HPF/ concentración</i>	<i>0.1%</i>	<i>0.5%</i>	<i>1.0%</i>	<i>1.5%</i>	<i>2.0%</i>	<i>2.3%</i>	<i>2.5%</i>	<i>3.0%</i>	<i>3.5%</i>	<i>Control</i>
12	1.60	1.03 *	1.40	1.06 *	1.47	1.30 *	1.38	0.78 *	0.70 *	1.93
24	5.67 *	3.62 *	5.00 *	3.89 *	5.22 *	4.73 *	4.82 *	2.90 *	2.50 *	6.77
48	9.28 *	6.13 *	7.08 *	6.64 *	8.77 *	7.92 *	8.17 *	4.76 *	4.27 *	11.60
72	11.79 *	8.05 *	8.70 *	6.22 *	11.78 *	10.47 *	9.60 *	6.32 *	5.62 *	15.47
96	12.25 *	8.57 *	8.98 *	6.61 *	11.48 *	10.73 *	10.28 *	6.59 *	5.97 *	16.43

Se resaltan con * los valores que muestran diferencias significativas con respecto al grupo control, con un valor de $p < 0.5$.

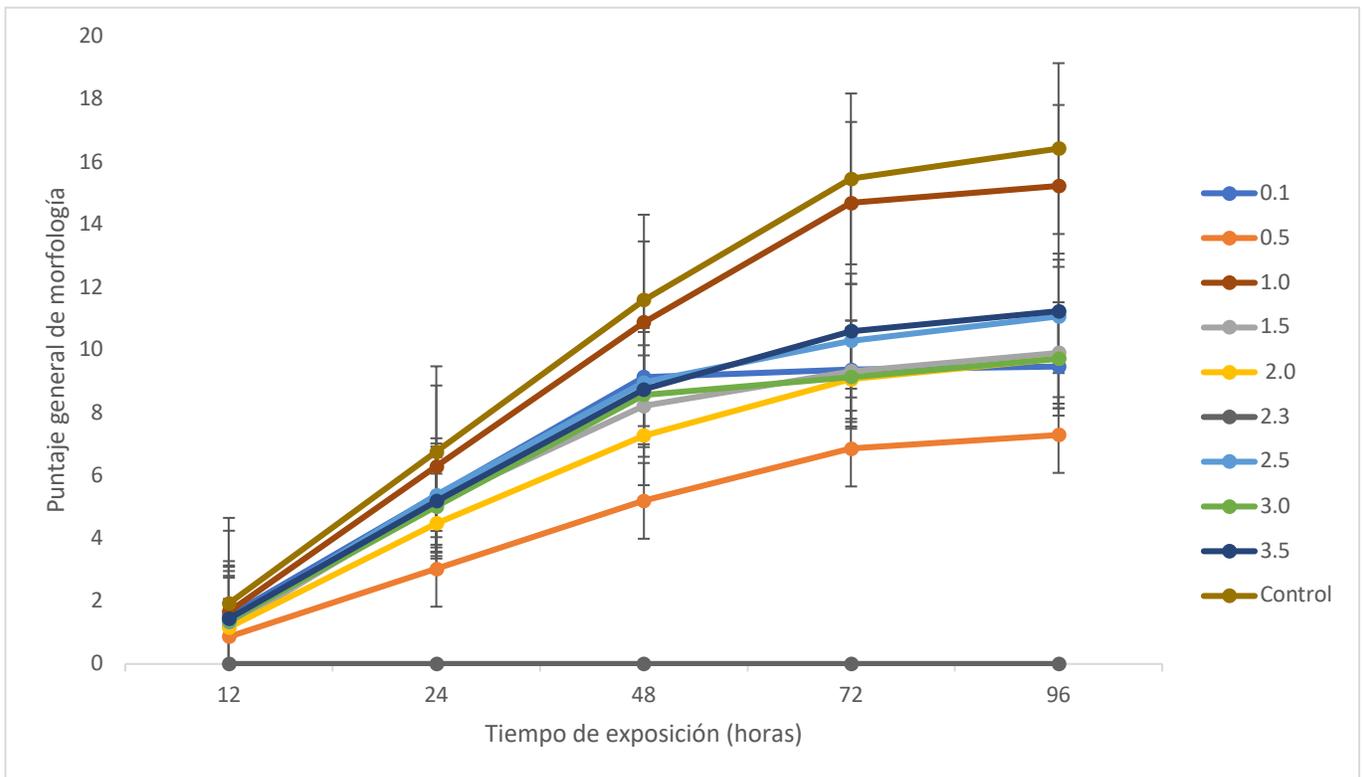


Figura 20. Promedios de puntuación morfológica en embriones expuestos al efluente.

Discusión

En los resultados obtenidos para el influente, se tiene que la DQO y la DBO de la muestra sobrepasan los límites permisibles de la norma, es decir que, esta agua no podría descargarse al sistema de alcantarillado municipal sin un tratamiento previo. Por su parte, el efluente de la PTAR muestra una disminución, tanto de la DQO, como de la DBO, con respecto al influente, los valores de las mismas en el efluente disminuyeron por debajo de los límites de la norma, incluso por debajo del límite de cuantificación del equipo; también disminuyó el pH en el efluente. Sin embargo, cabe destacar que la norma está vigente desde hace más de veinte años, por lo que en su creación no han sido considerados estudios recientes, los cuales muestran que los parámetros que se exigen en esta norma no son suficientes para garantizar que el agua cuenta con la calidad requerida para desecharse en el alcantarillado

municipal, sobre todo cuando se habla de mezclas complejas como lo son los efluentes hospitalarios.

Con respecto a lo anterior, uno de los parámetros que deberían comenzar a medirse y regularse en las descargas de efluentes de tipo hospitalario presencia de contaminantes emergentes, entre los que se encuentran los fármacos, los cuales destacan especialmente en este tipo de descargas. En este estudio se encontró que existe una disminución en la concentración de cada uno de los fármacos que fueron medidos, algunos llegaron a concentraciones indetectables para el equipo; sin embargo, dichos valores no pueden compararse con una norma, ya que no existe una regulación para la presencia de fármacos en el agua, por lo que se desconocen las concentraciones que deberían considerarse seguras. Es por ello que se realiza el estudio toxicológico, ya que el efluente, es decir el agua que se descarga en el alcantarillado municipal, cuenta con las características fisicoquímicas adecuadas de acuerdo a la norma (excepto por las concentraciones de metales pesados, los cuales no fueron medidos). Este estudio toxicológico permite analizar la seguridad del agua, la cual, a pesar de contar con las características establecidas en la normatividad, produjo efectos adversos en los organismos expuestos a ella. Dichos efectos podrían estar relacionados con la presencia de los fármacos, ya que al ser compuestos de actividad biológica, tienen efectos en las biomoléculas de los organismos.

El daño a las biomoléculas está en parte relacionado con la capacidad de los fármacos de causar estrés oxidativo. Una vez que el material genético y las proteínas resultan afectadas por la producción de especies reactivas de oxígeno, se desencadenan efectos a niveles macroscópicos en los organismos. Los efectos son visibles de manera rápida, en cuestión de solo unos días, al observarse el desarrollo embrionario, ya que es en estas etapas cuando ocurre una rápida replicación celular y cualquier efecto en una célula se verá reflejado en el desarrollo del organismo completo.

En este estudio se encontró que, en ambas muestras, tanto en el influente como en el efluente se presentó mortalidad en los organismos expuestos incluso a

concentraciones menores como 0.1 %, ya que se tuvo una mortalidad de más del 20% en ambas muestras, en las concentraciones mayores aumentó también la mortalidad gradualmente. Finalmente, se obtuvo que la CL_{50} para el influente fue de 1.466% y para el efluente fue de 2.484%, además la prueba t de student comparó la diferencia entre el número de organismos muertos en todas las concentraciones del influente con el número de organismos muertos en el efluente, encontrando que existe diferencia significativa, lo cual indica que el tratamiento del agua redujo la letalidad del agua residual. La mortalidad de los organismos ocurrió en las primeras etapas de desarrollo, en su mayoría dentro de las primeras 48 hpf, debido al efecto tóxico de los contaminantes presentes en el agua, lo cual también condujo a la presencia de malformaciones incompatibles con la sobrevivencia de los embriones.

En cuanto a las malformaciones, se tiene que también a bajas concentraciones se presentaron, ya que se obtuvo mediante el análisis probit que la $CE_{50\text{malformaciones}}$ para el influente fue de 3.468% y para el efluente de 6.096%, a pesar que esta concentración no fue probada en este estudio se determinó estadísticamente. El IT de cada una de las muestras resultó ser de 0.423 en el influente y de 0.407 en el efluente, con lo cual se tiene que ambas muestras producen mayormente efectos letales en el embrión y en menor medida son capaces de causar efectos teratogénicos. Sin embargo, se observa que la mortalidad en el influente es estadísticamente mayor que en el efluente (con la prueba t de student), lo cual prueba que el tratamiento del agua disminuye los efectos letales; sin embargo, no existe diferencia significativa entre el número de organismos que presentaron malformaciones tanto en el influente como en el efluente.

La observación de los organismos a los diferentes tiempos de desarrollo arrojó la presencia de diversas malformaciones producidas por la exposición a diferentes concentraciones de ambas muestras de agua. En los organismos expuestos al influente las malformaciones mayormente presentadas fueron eclosión prematura, no eclosión o retaso de la misma, deformaciones en la corda, deformación de cola, también se presentaron deformaciones del saco vitelino y edemas en el pericardio,

así como hipopigmentación del cuerpo en ese orden de frecuencia, entre otras que se presentaron en menor medida, algunos organismos presentaban incluso más de una de estas. En el efluente se presentaron también eclosiones prematuras, deformación de la corda, edemas en el pericardio, deformaciones del saco vitelino, deformación de la corda, no eclosión e hipopigmentación, ordenadas por la frecuencia con la que se presentaron.

Estas malformaciones tienen efectos que repercuten en el desarrollo y en la supervivencia de los embriones y las larvas. En el caso de los que eclosionaron de manera precoz tenían más probabilidades de morir a causa de esto debido a que, al eliminar la protección del corion, los embriones todavía inmaduros son incapaces de desempeñarse en el medio acuático externo; además en este caso la eclosión adelantada expone a los organismos, de una manera aún más directa, a los contaminantes del medio, lo que potencialmente podría aumentar el efecto letal y teratogénico en los mismos. Por otro lado, las deformaciones a nivel de la corda y de la cabeza están relacionadas con el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), por lo que si existen anomalías en estas estructuras también podría haberlas a nivel funcional.

Existen estudios, como el de Samson & Shenker (2000), donde describe el periodo que va desde las 18 hasta las 20 hpf como el más crítico ante la exposición a sustancias tóxicas, lo que corresponde con los resultados obtenidos, ya que la producción de malformaciones en los organismos puede observarse principalmente a partir de la observación que se hacía a las 24 hpf debido a que es en este periodo cuando se comienzan a formar algunas de las estructuras más importantes de los embriones como la aleta caudal, también el periodo de las 18 a las 26 hpf es crítico en la formación de la cola, la cual experimenta un rápido desarrollo en estas horas.

Las malformaciones en el saco vitelino tienen importancia en el desarrollo embrionario, ya que en esa etapa del desarrollo es el órgano con mayor actividad metabólica, lo cual lo convierte en uno de los órganos más propensos a presentar daño por estrés oxidativo y con ello daño a las biomoléculas, el cual se hace

evidente en estructuras visibles debido a la alta tasa de división celular que se presenta durante el desarrollo temprano (Otte et al., 2010).

Dentro de las primeras 12 hpf se lleva a cabo la diferenciación celular que da lugar a la correcta formación de la cabeza y la cola. Donde la correcta formación de la cabeza, no solo involucra el desarrollo del SNC, sino que también brinda información acerca de la interacción de genes homeobox (los cuales están involucrados en procesos de apoptosis y regulación del ciclo celular), dentro del desarrollo normal de la cabeza también se ven involucrados genes que regulan la formación de los ojos, la boca y el oído (Golling et al, 2002).

Otra de las malformaciones mayormente presentadas fue la de la cola, la cual es una de las más evaluadas en ensayos de teratogénesis, debido a que, al igual que en la formación de la cabeza intervienen una gran cantidad de genes y mediadores celulares; además de esto, la deformación de esta estructura es de vital importancia a nivel funcional, ya que su correcta formación permite que en las siguientes etapas del desarrollo la larva y el organismo adulto desempeñen su nado de manera correcta (Golling et al, 2002).

También se presentaron edemas en el pericardio, su formación se ha atribuido a la hiperhidratación del órgano debida a problemas en la regulación osmótica derivados de la acumulación de toxinas (Hollert et al., 2003; Cook et al., 2005; Hallare et al., 2005).

En la evaluación del desarrollo embrionario se obtuvieron diferencias significativas en el análisis ANOVA, en la mayor parte de las concentraciones a partir de las 24 hpf con respecto al control negativo, ya que es a partir de las 18 hpf cuando se comienza la formación de las estructuras mayormente afectadas por el daño teratogénico.

Conclusiones

El influente de la planta de tratamiento presentó un mayor efecto letal que el efluente de la misma, en ambas muestras se presentaron efectos teratogénicos sin diferencias significativas sobre los embriones de *Danio rerio*, por ello hace importante el estudio de nuevas técnicas de tratamiento de este tipo de efluentes específicos.

Proyecciones

Los estudios acerca de los efectos adversos que ocasionan los llamados contaminantes emergentes hacen cada vez más evidente la deficiencia en la regulación actual en la que no se contemplan como tales, por lo que no son considerados a eliminar en los tratamientos, es decir, existe un tratamiento genérico para todas las aguas de residuo, sin tomar en cuenta su composición. Dichos estudios empujan a considerar nuevas estrategias para que el reciclaje de aguas residuales se lleva a cabo de manera segura, sin representar un riesgo para la población en general y para el ambiente.

Es importante continuar con el trabajo de la evaluación del desarrollo embrionario ante la exposición de sustancias tóxicas, con el fin de conocer de qué manera y sobre cuáles estructuras se presenta un daño, así como para determinar el riesgo que estas representan para la supervivencia de los organismos al encontrarse en el ambiente; esto por una parte, por otra se tiene que los efectos en órganos específicos dan pauta al descubrimiento acerca de los tiempos de desarrollo de cada una de las estructuras, así como para la funcionalidad de las mismas al organismo desarrollado, también para la identificación de genes involucrados en el correcto desarrollo de los organismos.

El estudio de los efectos en las diferentes ventanas de exposición es otro de los campos de exploración que permitirían determinar el cambio en los efectos de las

sustancias tóxicas dependiendo del estadio del desarrollo en el que se expongan a los mismos.

Referencias

Agarwal, A., Saleh, R. y Bedaiwy, M. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, 79(4), 829-843.

Ali, S., Zeng, F., Cai, S., Qiu, B., Zhang, G. (2011). The interaction of salinity and chromium in the influence of barley growth and oxidative stress. *Plant Soil and Environment*, 57(4), 153–159.

Álvarez, C. (2011). *Efectos teratogénicos del nitrato de plomo en el desarrollo embrionario del pez cebra Danio rerio (Hamilton, 1822) a cinco dosis subletales* (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Columbia.

Anwar, Y., Hakeem, K., Alharby, H. y Alghamdi, K. (2018). *Environmental Excellence and Public Health Challenges*. En *Environmental Contamination and Remediation* (1-3). Cambridge Scholars Publishing: Inglaterra.

Ayala, N. (2014). *Estudio comparativo de los efectos de los anestésicos metanosulfonato de triclaína (MS-222) y eugenol, para su uso en el pez cebra (Danio rerio) como modelo experimental* (Tesis doctoral). Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

Báez, O. (2005). *Estudios de daños genotóxicos y teratogénicos en pez cebra (Danio rerio; Hamilton 1822) por acumulación del nivel de arsénico presente en el agua de Zimapán, Hidalgo* (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.

Barceló, D. (2003). Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, (10), XIV-XVI.

Beckman, D. y Brent, R. (1984). Mechanisms of teratogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 24, 483-500.

Bortagaray, V. (2013). *Evaluación de las propiedades embriotóxicas y teratogénicas de los herbicidas a base de glifosato mediante el bioensayo de toxicidad embrionaria larval en pez cebra (Danio rerio)* (Tesis de licenciatura). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Calderón, A., Meraz, M., y Tomasini, A. (2019). Pharmaceuticals Present in Urban and Hospital Wastewaters in Mexico City. *Journal of Water Chemistry and Technology*, 41(2), 105–112.

Castro, L., Baños, M., López, M. y Torres, B. (2015). Ecofarmacovigilancia en México: perspectivas para su implementación. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(3), 16-40.

Chen, Q., Sun, Y., Liu, Z., Li, Y. (2017). Sex-dependent effects of subacute mercuric chloride exposure on histology, antioxidant status and immune-related gene expression in the liver of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 188, 1-9.

Cook, L., Paradise, C. y Lom, B. (2005). The pesticide malathion reduces survival and growth in developing zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(7), 1745–1750.

Corrales, L. y Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135 – 250.

Daouk, S., Chèvre, N., Vernaz, N., Bonnabry, P., Dayer, P., Daali, Y. y Fleury-Souverain, S. (2015). Prioritization methodology for the monitoring of active

pharmaceutical ingredients in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*, 30, 1-9.

Díaz, L. (2013). *Evaluación del estrés oxidativo inducido por el efluente proveniente de una industria farmacéutica en branquias de Cyprinus carpio* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de México, México, México.

Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, 16 de diciembre de 2008.

Elizalde, A., Gómez, L., Islas, H., San Juan, N., Galar, M., García, S., Dublán, O. y Hernández, M. (2017). *Ecotoxicological studies of pharmaceuticals in aquatic organisms*. En *Ecopharmacovigilance* (75-94). Springer: México.

Gasca, E. (2015). *Evaluación del potencial anticonvulsivante y ensayos de toxicidad de la 5H-dibenzo(b,e)azepin-6,11-diona y la dibenzo(b,f)(1,4)diazocin-6,11(5H,12H)-diona* (Tesis doctoral). Universidad Veracruzana, Veracruz, México.

Gilbert, S. (2000). *Developmental biology*. Sinauer Associates, Inc: Reino Unido.

Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., Lin, S., Nissen, R. y Hopkins, N. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nature genetics*, 31, 135-140.

Gómez, L., Galar, M., Neri, N., Islas, H., Colín, A., Vieyra, P., San Juan, N., Dublán, O. y López, L. (2018). *Estrés oxidativo producido por antiinflamatorios no esteroideos sobre el bioindicador Hyalella azteca*. En *Estrés Oxidativo* (181-211). México: Universidad Autónoma del Estado de México.

González, L. (2005). *Evaluación del efecto del cloruro de mercurio (HgCl₂) en la inducción de malformaciones de columna vertebral del pez cebrá (Danio rerio;*

Hamilton 1822) durante diferentes etapas del desarrollo embrionario (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.

Hallarea, A., Kosmehlc, T. Schulzed, T. Hollertc, H. Kohlera, H. y Triebskorna, R. (2005). Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(7), 1745–1750.

Hermesen, S., Brandhof, E., Ven, L., Piersma, A. (2011). Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicology in Vitro*, 25, 745–753.

Hollert, H., Keiter, S., Konig, N., Rudolf, M., Ulrich, M. y Braunbeck, T. (2003). A New Sediment Contact Assay to Assess Particle-bound Pollutants Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Soils & Sediments*, 3(3), 197–207.

Horie, Y., Yamagishi, T., Yagi, A., Shintaku, Y., Iguchi, T., Tatarazako, N., (2018). The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium induces abnormal embryogenesis and delayed lethal effects in early life stage zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Applied Toxicology Wiley*, 1-8.

Hospitales Ángeles. (2019). Hospital Ángeles Puebla: Especialidades. Puebla, México: Corporativo GASS. Recuperado de <https://hospitalesangeles.com/puebla/especialidades.php>

Islas, H. (2013). *Evaluación de la toxicidad producida por la mezcla ibuprofeno-diclofenaco en Cyprinus carpio* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de México, México, México.

Jiménez, B. (2001). *La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada*. Limusa: México.

Keller, J., Keller, E. (2018). *The Use of Mature Zebrafish (Danio rerio) as a Model for Human Aging and Disease*. En *Conn's Handbook of Models for Human Aging* (351-359). Estados Unidos: Elsevier Inc.

Kimmel, C. y Law, R. (1985). Cell lineage of zebrafish blastomeres: II. Formation of the yolk syncytial layer. *Developmental Biology*, 108(1), 86-93.

Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B. y Schilling, T. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203, 253-310.

Kookana, R. Williams, M. Boxall, M. Larsson, J. Gaw, S. Choi, K. Yamamoto, H. Thatikonda, S. Zhu, Y. y Carriquiriborde, P. (2014). Potential ecological footprints of active pharmaceutical ingredients: an examination of risk factors in low-, middle- and high-income countries. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 369, 1-16.

León, M. (2015). *Caracterización físico-química, biológica y ecotoxicológica del agua residual de un hospital de la ciudad de Cuenca* (Tesis de maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

Li, Q., Wang, P., Chen, L., Gao, H. y Wu, L. (2016). Acute toxicity and histopathological effects of naproxen in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Environmental Science and Pollution Research*.

Lomba, L., Ribate, M., Zuriaga, E., García, C. y Giner, B. (2019). Acute and subacute effects of drugs in embryos of *Danio rerio*. QSAR grouping and modelling. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 232-239.

Luja, M., Gómez, L., San Juan, N., Islas, H., Orozco, J., Heredia, G., Galar, M. y Dublán, O. (2019). Alterations to embryonic development and teratogenic effects

induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes. *Science of the Total Environment*, 660, 751-764.

Namihira, D. (2004). Conceptos básicos en ecología y su relación con la toxicología ambiental. En *Toxicología ambiental* (52-54). Universidad de la Ciudad de Juárez: México.

Nesan, D. y Vijayan, M. (2012). Embryo exposure to elevated cortisol level leads to cardiac performance dysfunction in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 363, 85-91.

Oliveira, T., Murphy, M., Mendola, N., Wong, V., Carlson, D. y Waring, L. (2015). Characterization of pharmaceuticals and personal care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Science of the Total Environment*, 518-519, 459–478.

Oliveira T., Al Aukidy M., Verlicchi P. (2017). *Occurrence of Common Pollutants and Pharmaceuticals in Hospital Effluents*. En: *Hospital Wastewaters. The Handbook of Environmental Chemistry* (17-32). Springer International Publishing: Suiza.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2013). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 236 - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.

Orias, F. y Perrodin, Y. (2014). Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere*, 30, 1-9.

Ottea, J., Schmidt, A., Hollert, H. y Braunbeck, T. (2010). Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 100, 38-50.

Penagos, D., Ortega, J. y Rodríguez, T. (2012). Remoción de la materia orgánica y toxicidad en aguas residuales hospitalarias aplicando ozono. *Dyna*, 79(173), 109-115.

Peña, C., Carter, D. Ayala, F. (2001). Toxicología Ambiental: Evaluación de riesgos y restauración ambiental (40-95). Estados Unidos: Universidad de Arizona.

Peña, M. (2008). *Evaluación del efecto de la temperatura en la teratogenicidad del mercurio en embriones del pez cebra, método DarTa* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.

Pérez, I., Islas, H., Gómez, L., Barceló, D., López, M., Pérez, S., Sánchez, L., San Juan, N. y Galar, M. (2018). Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, Mexico, and evaluation of their toxic impact. *Environmental Pollution*, 240, 330-341.

Quesada, I., Jáuregui, U., Wilhelm, A. y Delmas, H. (2009). Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 40(3), 173-179.

Quintero, A. (2017). *Evaluación ecotoxicológica de la carbamazepina y los nonilfenoles en agua* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Ramos, C. (2008). Aguas residuales generadas en hospitales. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 29(2), 56-60.

Rivera, I. (2006). *Determinación de la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta en Danio rerio Hamilton, 1822, como posibles biomarcadores en la valoración de daño teratogénico* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.

Ronco, A., Días, M. Pica, Y. (2004). *Conceptos Generales*. En *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones* (232). Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: México.

Samson, J. y Shenker, J. (2000). The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 48, 343–354.

Santos, L., Gros, M., Rodríguez, S., Delerue, C., Peña, A., Barceló, D. y Montenegro, M. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 461–462, 302–316.

Solis, S. (2013). *Alteraciones en el desarrollo embrionario del pez cebra por exposición a muestras del Río Atoyac y descargas industriales* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Tejada, C., Quiñonez, E., Peña, M. (2014). Contaminantes emergentes en aguas: metabolitos de fármacos: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 80-101.

Vera, I., Sáez, K. y Vidal, G. (2013). Performance of 14 full-scale sewage treatment plants: comparison between four aerobic technologies regarding effluent quality, sludge production and energy consumption. *Environmental Technology*, 34(13-16), 2267-75.

Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M. y Barceló, D. (2012). Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 430, 109-118.

Weiss, B. y Doherty, R. (1986). *Teratogen Update: Environmentally Induced birth Defect Risks*. J.L. Sever and R.L. Brent: Estados Unidos.

Wilson, K., Matrone, G., Livingstone, D., Al-Dujaili, E., Mullins, J., Tucker, C., Hadoke, P., Kenyon, C. y Denvir, M. (2013). Physiological roles of glucocorticoids during early embryonic development of the zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of Physiology*, 591 (24), 6209–6220.

Wixon, J. (2000). Featured Organism: *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast*, 17, 225-231.

Yañez, J. (2005). *Análisis de dos isoformas de la proteína quinasa CK1 en el desarrollo embrionario del pez cebra (Danio rerio)* (Tesis de licenciatura). Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Zhang, K., Yuan, G., Werdich, A. y Zhao, Y. (2019). Ibuprofen and Diclofenac Impair the Cardiovascular Development of Zebrafish (*Danio Rerio*) at Low Concentrations. *Environmental Pollution*, 1-33.

Zhu, L., Shao, Y., Xiao, H., Santiago, B., Meyer., H., Schiwy, S., Yin. D., Hollert, H. y Küppers, S. (2018). Electrochemical simulation of triclosan metabolism and toxicological evaluation. *Science of The Total Environment*, 622–623, 1193-1201.

Anexos

Anexo 1.

Tabla de puntuación general de morfología para *Danio rerio* publicada por Hermesen et al. en 2011 (**Fig. 21.**).

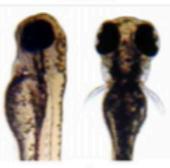
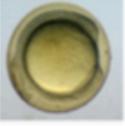
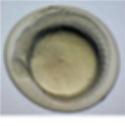
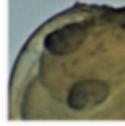
General Morphology Score				
Hpf	12	24	48	72
Detachment of tail	 0			
Somite formation	 18hpf 1	2	3	3
Eye development	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Movement	 1	 2	 2 + 1 for pigment	 2 + 1 for pigment
Heartbeat	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Blood circulation	No = 0	No = 0	Yes = 1	Yes = 1
Pigmentation head-body	0	 0	 1	 1
Pigmentation tail	0	 0	 1	 1
Pectoral fin	0	0	 0	 1
Protruding mouth	0	0	 0	 1
Hatching	No = 0	No = 0	No = 0	Yes = 1
GMS	1	7	12	15

Figura 21. Puntuación general de morfología para *D. rerio* por Hermesen et al. en 2011.

Anexo 2.

Tabla de puntuación general de morfología para *Cyprinus carpio* publicada por Luja et al. en 2019 (**Fig. 22.**), modificación de la puntuación general de morfología de Hermesen et al., 2011.

General Morphology Score (GMS)					
	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
<i>Detachment of tail</i>	 0				
					
	1	2	3	3 + 1 for pigment	3 + 1 for pigment
<i>Somite formation</i>	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
<i>Eye development</i>	 1	 2	 2 + 1 for pigment	 2 + 1 for pigment	 2 + 1 for pigment
<i>Movement</i>	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
<i>Heartbeat</i>	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
<i>Blood circulation</i>	No = 0	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1

<i>Pigmentation head-body</i>	0	0	  1	 1	 1
<i>Pigmentation tail</i>	0	0	 1	 1	 1
<i>Pectoral fin</i>	0	0	0	 1	 1
<i>Protruding mouth</i>	0	0	0	 1	 2
<i>Hatching</i>	No = 0	No = 0	No = 0	 Yes = 1	 Yes = 1
<i>GMS</i>	2	7	12	16	17

Figura 22. Puntaje general de morfología por Luja et al., 2019.

Anexo 3.

Malformaciones reportadas en *D. rerio* (**Fig. 23.**): edema pericárdico, edema del saco vitelino, edema ocular, malformación de la cabeza, malformación de otolitos, malformación de cola, malformación de corazón, estructura de cuerda modificada, escoliosis, raquisquisis y deformación del saco vitelino (Hermsen et al., 2011)

Table 1

List of teratogenic effects scored in zebrafish embryos.

Pericardial edema
Yolk sac edema
Eye edema
Malformation of the head
Malformation of sacculi/otoliths
Malformation of tail
Malformation of heart
Modified chorda structure
Scoliosis
Rachischisis
Yolk deformation

Effects are scored as present or absent.

Figura 23. Malformaciones reportadas por Hermsen et al., 2011 para *D. rerio*.