



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA



“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR BISFENOL-A SOBRE EMBRIONES
Y ADULTOS DE *Danio rerio*”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

PRESENTA:
GERARDO HEREDIA GARCÍA

DIRIGIDA POR
DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN
DR. OCTAVIO DUBLÁN GARCÍA
DRA. HARIZ ISLAS FLORES



TOLUCA, MÉXICO, FEBRERO 2023

ÍNDICE GENERAL

	Pág
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
I. MARCO TEÓRICO	2
1.1 Agua y contaminación	2
1.2 Contaminantes emergentes	3
1.3 Contaminantes plásticos	4
1.3.1 Microplásticos	5
1.4 Bisfenol-A	6
1.4.1 Metabolismo y mecanismo de acción del BPA	7
1.4.2 Ocurrencia de BPA en medio ambiente	8
1.4.3 Toxicidad de BPA	9
1.5 El pez cebra como modelo de toxicología y embriología	12
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	17
2.1 Sustancia de prueba	17
2.2 Obtención y mantenimiento de los organismos de prueba	18
2.3 Diseño experimental	18
2.3.1 En embriones de <i>Danio rerio</i>	18
2.3.1.1 Pruebas de toxicología en embriones de <i>Danio rerio</i>	18
2.3.1.2 Evaluación de estrés oxidativo en larvas de <i>Danio rerio</i>	19
2.3.2 En adultos de <i>Danio rerio</i>	20
2.3.2.1 Prueba de comportamiento Novel Tank	20
2.3.2.2 Pruebas de estrés oxidativo en cerebros de <i>Danio rerio</i>	21
2.3.2.3 Determinación de acetilcolinesterasa	22
2.4 Análisis estadístico	23
III. RESULTADOS	23
3.1 Embriotoxicidad y teratogenicidad en embriones de <i>Danio rerio</i>	23
3.2 Principales malformaciones en embriones de <i>Danio rerio</i>	25
3.3 Evaluación de estrés oxidativo en embriones de <i>Danio rerio</i>	30
3.4 Pruebas de comportamiento en adultos de <i>Danio rerio</i>	32

3.5	Biomarcadores de estrés oxidativo en cerebros de <i>Danio rerio</i>	34
3.6	Determinación de acetilcolinesterasa en cerebros de <i>Danio rerio</i>	36
IV	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
4.1	Embriones <i>Danio rerio</i>	37
4.2	Adultos <i>Danio rerio</i>	43
V	CONCLUSIONES	46
VI	REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
1. Estructura química del Bisfenol-A	6
2. Desarrollo embrionario del pez cebra	14
3. Porcentaje de embriones de <i>Danio rerio</i> normales, muertos y teratogénicos	25
4. Malformaciones presentes en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a BPA	26
5. Puntuaciones de morfología general de embriones <i>Danio rerio</i> expuestos a BPA	27
6. Principales malformaciones presentes en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a BPA	28
7. Biomarcadores de estrés oxidativo en larvas de <i>Danio rerio</i> expuestas a BPA	31
8. Parámetros de comportamiento en <i>Danio rerio</i> adultos a las 96 h de exposición de BPA	32
9. Biomarcadores de estrés oxidativo en cerebros de <i>Danio rerio</i> adultos expuestos a BPA	34
10. Determinación de acetilcolinesterasa en cerebros de <i>Danio rerio</i> adultos expuestos a BPA	36

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
1. Presencia de BPA	8
2. Estudios de toxicidad en <i>Danio rerio</i>	11
3. Pruebas de estrés oxidativo en cerebros de <i>Danio rerio</i>	22
4. Cuantificación de BPA en agua y cerebros de <i>Danio rerio</i>	23
5. Porcentaje de mortalidad y malformaciones en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a BPA	24

RESUMEN

La presencia de Bisfenol-A (BPA) en medios acuáticos ha sido reportada en diversas investigaciones a concentraciones de ng/L. Estudios previos determinan a este compuesto como un disruptor endocrino que origina daño celular y genera estrés oxidativo en múltiples especies, además de poseer un potencial efecto teratogénico, embriotóxico y neurotóxico sobre los organismos. Con los antecedentes previamente expuestos, se planteo como objetivo evaluar estrés oxidativo sobre embriones de *Danio rerio* a las 72 y 96 horas post fertilización (hpf), así como el efecto teratogénico y embriotoxicidad a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf, también se evaluó la neurotoxicidad en adultos de *Danio rerio* al tiempo de 96 h de exposición. Los embriones fueron expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes (220, 380, 540, 700, 860, 1180, 1340 y 1500 ng/L) de BPA, para estrés oxidativo se determinaron los siguientes biomarcadores: contenido de hidropéroxidos(HPC), proteínas carboniladas (PCC), lipoperóxidos (LPX); actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX)). En el caso de neurotoxicidad los organismos fueron expuestos a tres concentraciones ambientales (220, 860 y 1500 ng/L), determinando estrés oxidativo en cerebro, contenido de acetilcolinesterasa y pruebas de comportamiento. Los resultados obtenidos mostraron que BPA es capaz de inducir daño oxidativo, tanto en embriones como en cerebros de adulto. Lo que respecta al efecto teratogénico se calculó el Índice Teratogénico (IT) que fue de 1.25. Las pruebas de neurotoxicidad mostraron disminuciones en la presencia de acetilcolinesterasa y disminución en la capacidad motora de este organismo. De acuerdo a los resultados obtenidos se concluyó que el BPA generó estrés oxidativo, efectos

teratogénicos, embriotoxicidad y neurotoxicidad en embriones y adultos de *Danio rerio* a concentraciones ambientalmente relevantes.

ABSTRACT

The presence of Bisphenol-A (BPA) in aquatic environments has been reported in several investigations at concentrations of ng/L. Previous studies have determined this compound as an endocrine disruptor that causes cell damage and generates oxidative stress in multiple species, in addition to having a potential teratogenic, embryotoxic and neurotoxic effect on organisms. With the previously exposed background, the objective of this research was to evaluate the oxidative stress on *Danio rerio* embryos at 72 and 96 hours post-fertilization (hpf), as well as the teratogenic effect and embryotoxicity at 12, 24, 48, 72 and 96 hpf, and the neurotoxicity in *Danio rerio* adults at 96 h of exposure was also evaluated. Embryos were exposed to environmentally relevant concentrations (220, 380, 540, 700, 860, 1180, 1340 and 1500 ng/L) of BPA, for oxidative stress the following biomarkers were determined: hydroperoxides (HPC), protein carbonyl content (PCC), lipoperoxides (LPX); superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) activity.) In the case of neurotoxicity, the organisms were exposed to three environmental concentrations (220, 860 and 1500 ng/L), determining oxidative stress in the brain, acetylcholinesterase content and behavioral tests. The results obtained showed that BPA is capable of inducing oxidative damage in both embryos and adult brains. Regarding the teratogenic effect, the Teratogenic Index (TI) was calculated to be 1.25. The neurotoxicity tests showed decreases in the presence of acetylcholinesterase and a decrease in the motor capacity of this organism. With the data obtained we were

able to conclude that BPA is capable of generating oxidative stress, teratogenic effects, embryotoxicity and neurotoxicity in embryos and adults of *Danio rerio* at environmentally relevant concentrations.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas acuáticos son de gran importancia, ya que, mantienen el equilibrio de los demás ecosistemas y contienen hasta un 80% de todos los organismos que residen en el planeta (Isan, 2017). El elemento primordial y base de la vida es el agua, la cual es esencial para el desarrollo de la vida ya que interviene en los procesos biológicos de los organismos y se emplea en las actividades antropogénicas como la agricultura, la producción industrial y la generación de energía, estando sujeta a cambios provocados por estas actividades (Bossingham, Carnell and Campbell, 2005).

La contaminación de los efluentes naturales terrestres y subterráneos con diferentes especies químicas bioacumulables ha causado un desequilibrio ecológico notable, como es el uso de materiales plásticos (Li et al., 2021). El alto uso de éstos ha sido tomado en cuenta como un potencial contaminante debido a sus múltiples usos en infraestructuras, empaques alimentarios, bolsas, etc. y han sido considerados como contaminantes emergentes, como consecuencia han sido introducidos al medio ambiente por diversas vías, afectando la vida acuática (Zuccato et al., 2006).

Los contaminantes plásticos se encuentran en diversas matrices ambientales y representan un peligro para los organismos que al consumirlos no se llevan a cabo un proceso de digestión y mueren por inanición (Bhagat et al., 2021). Por otro lado, los contaminantes pueden contener sustancias que son tóxicas e intervenir directamente con procesos metabólicos al ser consumidos, dichas sustancias pueden ser: parabenos policlorados, pesticidas o incluso Bisfenol-A (BPA) que es el compuesto empleado para la elaboración de ciertos plásticos como los policarbonatos (Wells, 2019).

Se ha visto en estudios previos que el BPA es capaz de provocar estrés oxidativo en especies acuáticas, por lo que es posible que pueda observarse un daño a nivel genético y capacidad motora (Zhu et al., 2019).

El objetivo de la presente investigación consistió en determinar la toxicidad producida por Bisfenol A usando como bioindicador a *Danio rerio* a través de biomarcadores de estrés oxidativo, embriotoxicidad, teratogenicidad y neurotoxicidad.

I. MARCO TEÓRICO

1.1. El agua y contaminación

El agua es el recurso natural considerado como fuente primordial de vida, debido a que es esencial en los procesos biológicos e importante en la alimentación, higiene y actividades humanas. (Bossingham et al., 2005).

Existe una gran presencia de organismos en ecosistemas acuáticos, por lo que el impacto por la contaminación puede llegar a afectar a una gran cantidad de especies induciendo cambios en la estructura de las comunidades, función biológica y fisiológica, lo cual puede afectar el ciclo de vida, crecimiento y condiciones reproductivas de dichas especies (Bartram y Ballance, 1996 citado en Vázquez et al., 2006).

Los organismos acuáticos como los peces, pueden ser considerados como excelentes indicadores de la calidad del medio, por lo cual, al encontrarse en altas cantidades en el ecosistema funjen como indicador de un ambiente sano (De la lanza, 2000).

Los cambios en la forma de vida conlleva al incremento de la actividad industrial y a la creación y generación de una gran cantidad de sustancias químicas contaminantes como plaguicidas, hidrocarburos, productos para cuidado personal, plásticos, alcoholes, detergentes, fármacos y desechos orgánicos, teniendo como destino final los cuerpos de agua pudiendo causar un impacto sobre las especies acuáticas (Zuccato et al., 2005). Los contaminantes plásticos podrían estar generando un desequilibrio en los ecosistemas.

1.2. Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes (CE) son aquellos compuestos de diferente origen y naturaleza química, y su presencia en el medio ambiente no se considera significativa,

pasando inadvertidos; no obstante, actualmente están siendo detectados y se sabe que pueden generar un impacto ecológico y efectos adversos en diferentes organismos (Barceló et al., 2007; Stuart et al., 2012). Una de sus características principales es que estos contaminantes no necesitan persistir en el ambiente para provocar un efecto adverso sobre las especies, ya que, su entrada al ambiente se da de forma continua (Barceló et al., 2007).

Se ha reportado que dichos compuestos son capaces de entrar al ambiente a través de aguas residuales de tipo doméstico e industrial, también de los residuos de las plantas de tratamiento, de los efluentes tanto hospitalarios como industriales, de las actividades antropogénicas y de los tanques sépticos, los cuales contienen un gran número de compuestos orgánicos específicos y las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos; motivo de preocupación científica y para las entidades ambientales reguladoras.

Los contaminantes emergentes son parte de una gran cantidad de compuestos químicos, productos de cuidado personal, productos farmacéuticos, agentes tensoactivos, plastificantes y aditivos industriales, que no están incluidos en las normas de monitoreo actual; también incluyen la síntesis de nuevos compuestos químicos o cambios en el uso y disposición de los productos químicos ya existentes, de los cuales existe una limitada información disponible sobre el efecto que puede causar en la salud humana y en la ecología. Por estas razones, la mayoría de las nuevas investigaciones han centrado sus estudios en la aparición de estos contaminantes orgánicos en aguas superficiales, como las utilizadas en actividades domésticas, que luego reciben tratamiento químico; en aguas de arroyos; aguas residuales con tratamiento biológico, y en agua potable (de consumo humano), entre otras, ya que estas son más susceptibles de contener concentraciones mayores de contaminantes emergentes que las aguas subterráneas.

1.3. Contaminantes plásticos

Actualmente los plásticos están presentes en todos los ámbitos de la vida humana, usados ampliamente como empaques, artefactos plásticos y dispositivos médicos. Sin

embargo, su creciente producción genera una problemática ambiental debido a su abundancia y persistencia en el medio (US EPA, 2012). Según datos de la ONU cada año se producen 400 millones de toneladas de plástico en el mundo y sólo un 9% es reciclado, México ocupa el undécimo lugar productor de plástico con 7 millones de toneladas anuales.

Entre los principales residuos de plástico encontrados, destacan las botellas, pitillos, bolsas plásticas, vasos y envolturas de alimentos. Los residuos plásticos son descargados al medio ambiente a través de tiraderos de basura mal gestionados, así como las plantas de tratamiento de aguas residuales (Geyer, Jambeck and Law, 2017).

La problemática radica en las grandes cantidades de plástico que es desechado y se ha demostrado que algunos pueden perdurar en el medio hasta 500 años para degradarse, por lo tanto, gran parte de los organismos quedan expuestos, confundiendo dichos plásticos con alimento que al ingerirlo afecta su tracto digestivo provocando saciedad y con ello mueren por inanición. Algunos plásticos también pueden contener sustancias tóxicas lo cual coloca en gran peligro a la fauna (Maldonado, 2012).

Los contaminantes plásticos también incluyen a pequeñas piezas de plástico en el rango de milímetros denominados microplásticos, los cuales se han convertido en una gran preocupación debido a la facilidad con la que se distribuyen en diversas matrices ambientales como son el agua, sedimentos, aire y organismos (Sarria-Villa and Gallo-Corredor, 2016).

1.3.1. Microplásticos

Los microplásticos son partículas de tamaño no mayor a 5mm que se clasifican como primarios o secundarios en función de su procedencia (Sarria and Gallo, 2016).

- Microplásticos primarios: Son aquellos plásticos manufacturados con un tamaño menor a 5 mm, los cuales tienen aplicación en pellets industriales, así como

fragmentos para productos de cuidado personal como son la pasta de dientes, geles de baño y cremas.

- Microplásticos secundarios: estos se forman por la degradación química (oxidaciones), física (calor, luz UV, acción mecánica) y/o degradación microbiana de productos plásticos.

La mayor parte de microplásticos en sistemas acuáticos son derivados de fuentes secundarias. La ONU estima que se encuentran hasta 51 000 millones de partículas plásticas en el mar.

La mayor fuente de microplásticos en los cuerpos de agua incluye las aguas residuales de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y el runoff de las zonas urbanas, rellenos sanitarios y áreas industriales. El amplio uso y degradación de los plásticos ha dado como resultado su amplia distribución de los microplásticos en el medio ambiente (Cole *et al.*, 2011; Rillig, 2012; Ivar Do Sul and Costa, 2014). La preocupante deposición de plásticos a través de varias décadas en el ambiente marino se ha incrementado debido a la exposición de los organismos marinos a los plásticos. Algunos microplásticos son lo suficientemente pequeños para ser ingeridos por pequeños animales como el zooplancton (Auta, Emenike and Fauziah, 2017).

Sustancias tóxicas han sido encontrados en el ambiente marino adsorbidos a la superficie de los plásticos a concentraciones un millón de veces más alta que las concentraciones encontradas en el agua de mar (Mato *et al.*, 2001). Estas toxinas incluyen los bifenilos policlorados (PCBs), los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) y plaguicidas como el DDT (Hirai *et al.*, 2011; Sarria-Villa *et al.*, 2016). Adicionalmente, algunos compuestos son potencialmente tóxicos (Bisfenol A) son empleados en la manufactura de los plásticos. Un segundo aspecto, relacionado con la ingesta de microplásticos es la adsorción de todo este tipo de toxinas en los tejidos animales (Battocletti, 2011).

1.4. Bisfenol-A

La figura 1 muestra la estructura química del Bisfenol-A (BPA) [4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano], este un compuesto se utiliza comunmente en la industria para la fabricación de algunos materiales plásticos como los policarbonatos. En 200 se reportó una producción de 3.8 millones de toneladas (FitzGerald and Wilks, 2014). La forma de sintetizarlo es a partir de la condensación de dos moléculas fenol con una molécula de acetona en presencia de ácido clorhídrico (Vandenberg *et al.*, 2009). Se sintetizó por primera vez en 1891 por el químico ruso Aleksandr Dianin, pero hasta principios de 1930 no se conocieron sus propiedades y actividad estrogénica (Dodds and Lawson, 1936).

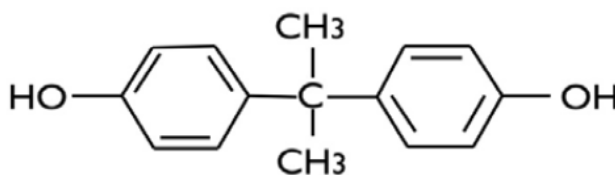


Figura 1. Estructura química del Bisfenol A

Se conoce que el BPA pertenece al grupo de compuestos disruptores endocrinos (DE) (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Estudios reportan que el BPA tiene afinidad por los receptores de estrógenos y, por tanto, posee la capacidad de producir efectos a nivel celular.

Los casos más graves que se reportan de este compuesto como DE, se han visto en niños de madres expuestas durante el embarazo, es por ello que gran cantidad de estudios se centran en evaluar la exposición prenatal y los efectos en niños (Braun and Hauser, 2011).

Existe una relación dosis-respuesta en relación del BPA con los DE, teniendo un comportamiento de hormesis, es decir, a concentraciones bajas produce el efecto máximo. De acuerdo a lo mencionado es importante evaluar su potencial tóxico a concentraciones bajas (Vandenberg *et al.*, 2012).

1.4.1. Metabolismo y mecanismo de acción del BPA

El BPA se metaboliza de forma rápida principalmente en el hígado, generándose un metabolito soluble (BPA-glucoronido) (Völkel *et al.*, 2002). Otra fracción de este compuesto interacciona con sulfato, generando BPA-sulfato (Geens *et al.*, 2012). Este proceso de conjugación se considera como una desintoxicación (Matthews, Twomey and Zacharewski, 2001), al eliminarse de manera eficiente por la orina. Cuando el BPA ingresa de forma oral, la fracción libre es muy poco biodisponible, lo cual permite deducir que la eficacia de la eliminación dada en el primer paso hepático (EFSA, 2017). Es conocido que el BPA conjugado no interacciona con los receptores estrogénicos, sin embargo, el porcentaje libre puede interaccionar con dichos receptores y generar alteraciones hormonales y con ello los efectos adversos (Mileva *et al.*, 2014).

Respecto al mecanismo de acción del BPA, este variará en función de la dosis, el tejido y el tipo de exposición al compuesto (vom Saal and Hughes, 2005). El BPA es un estrógeno sintético capaz de alterar y generar respuestas celulares en diferentes órganos y tejidos a dosis relativamente bajas, teniendo una fuerte afinidad a los receptores de estrógenos (Alonso-Magdalena *et al.*, 2012).

1.4.2. Ocurrencia de BPA en medio ambiente

La contaminación por BPA ocurre a niveles de ng y µg/L, debido a que el bisfenol se degrada en el medio ambiente relativamente fácil este no se presenta en altas concentraciones a pesar de la masiva producción de este compuesto.

Existen diversos estudios sobre la presencia de BPA en el medio ambiente, destacando los que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Presencia de BPA

Concentraciones ambientales	País	Referencia
12 ng/L (ríos)	Japón	(Yamazaki <i>et al.</i> , 2015)
380 ng/L (ríos)	India	(Yamazaki <i>et al.</i> , 2015)
23 ng/L (ríos)	China	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
222 ng/L (sedimentos)	U S	(Hu <i>et al.</i> , 2019)
0.11 ng/L (sedimentos)	China	(Huang <i>et al.</i> , 2018)
24.4-319 ng/L (agua residual)	Colombia	(Madera-Parra <i>et al.</i> , 2018)
1586 ng/L (agua residual)	México	(Chávez-Mejía <i>et al.</i> , 2008)

1.4.3. Toxicidad de BPA

Lo que respecta a estudios de toxicidad, se han realizado una gran variedad de investigaciones en animales a dosis bajas <50 µg/kg, determinando efectos en el neurocomportamiento y efectos reproductivos en ratas (Mathisen *et al.*, 2013).

El BPA también se ha visto relacionado, en numerosos estudios con daño oxidativo y su consecuente daño al ADN. (Gassman *et al.*, 2015) reportan que el BPA a concentraciones de 150 µM, aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de suprimir la reparación de ADN por escisión de bases, en cultivos celulares de ratones.

Además, se ha visto relacionado con el aumento de la presencia de micronúcleos a concentraciones de 1×10^{-4} mol/L, en cultivos de linfocitos de bovinos. Con ello, se ha demostrado que el BPA es capaz de dañar el ADN, por lo que es clasificado como un agente genotóxico (Šutiaková, Kovalkovičová and Šutiak, 2014).

Compuestos como el malonildialdehído (MDA) y óxido nitroso (NO) pueden servir como biomarcadores de daño oxidativo, al verse aumentados por la exposición a BPA de 0.5-50 mg/kg p/día de BPA durante 20 días en ratones (Eid, Eissa and El-Ghor, 2015). Otro estudio reporta que el BPA alteró los sistemas de reparación de ADN, en esta investigación disminuyó la capacidad antioxidante de la célula del tejido hepático (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa). Los biomarcadores utilizados evidenciaron el daño al material genético (Eid, Eissa and El-Ghor, 2015). Por otro lado, cuando las dosis de BPA son superiores (3000 mg/kg p/día) y la exposición es de mayor a 5 semanas, los análisis del genoma no muestran cambios en la metilación del ADN, ni daños consecuentes de la exposición del BPA en el tejido hepático de ratones C57BL/6J (van Esterik *et al.*, 2014).

Por lo tanto, en algunos estudios se observa que la exposición a BPA, a dosis bajas produce daño en DNA, aumenta la producción de radicales libres y disminuye la efectividad de los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo.

El BPA también se encuentra relacionado con los efectos al sistema metabólico, y es uno de los campos que más han sido estudiados. Diversas investigaciones sugieren que la exposición a BPA genera una alteración en el metabolismo o parámetros metabólicos de importante regulación, generando enfermedades metabólicas, como pueden ser: obesidad, diabetes o el síndrome metabólico. Actualmente, se desconocen en los mecanismos específicos mediante el cual el BPA contribuye al desarrollo de enfermedades metabólicas, pero recientemente, se ha visto que las alteraciones producidas en el ADN pueden ser un punto de partida de la afectación. La predisposición genética y los

contaminantes ambientales, capaces de alterar el genoma de la población, están teniendo un papel importante en la epidemiología de la diabetes, obesidad u otras enfermedades metabólicas (Thayer *et al.*, 2015).

También se ha reportado que el BPA también provoca alteraciones a nivel neuronal. La morfología de las neuronas motoras primarias y secundarias, se ha visto afectada bajo una exposición de 15 μM en embriones del pez spp *Danio rerio*. Además, la exposición a BPA a concentraciones menores (1-15 μM) altera la locomoción y movimientos involuntarios de esta especie, ya que se ve perjudicado el movimiento espontáneo de los embriones, y una vez eclosionado también decrece la velocidad al nadar y la respuesta a la estimulación. Las deficiencias observadas en la locomoción podrían relacionarse con el daño producido en la estructura del musculo esquelético y las vías de señalización neuronal (Wang *et al.*, 2013).

En la siguiente tabla se muestran algunos estudios realizados en pez cebra

Tabla 2. Estudios de toxicidad en *Danio rerio*

Concentración con efecto	País	Efecto	Referencia
228- 3424 $\mu\text{g/L}$ (Embriones de <i>Danio rerio</i>)	China	<p>a) Alteración del movimiento espontáneo, disminución de la velocidad al nadar y de la respuesta al toque de estimulación.</p> <p>b) BPA produce muerte celular apoptótica.</p> <p>c) BPA induce la formación de ROS.</p> <p>d) BPA induce daño en el ADN.</p> <p>e) No hay efectos teratógenos a ninguna concentración.</p>	(Wang <i>et al.</i> , 2013)

		f) BPA induce daño en el musculo esquelético axial en todas las concentraciones.El trastorno del crecimiento axonal de las motoneuronas primarias y secundarias solo ocurre cuando la concentración es15 µM.	
100 µg/L	China	Disminución de gonadotropina en pez cebra	(Qiu <i>et al.</i> , 2020)
0.01, 0.1, 1 mg/L	Reino Unido	Disminución de ovoposición, reducción de fertilización en pez cebra	(Laing <i>et al.</i> , 2016)

Cabe mencionar que en estos estudios se emplearon concentraciones por encima a las encontradas en ambientes acuáticos.

1.5. El pez cebra como modelo en Toxicología y embriología

Los peces teleósteos son usados ampliamente en pruebas de biomonitoreo de cuerpos de agua debido a que su historia de vida favorece el contacto con los contaminantes y resultan tener cierta sensibilidad a los contaminantes, por lo que, es confiable obtener respuestas a la exposición de sustancias químicas (Arellano-Aguilar, 2018). El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo de prueba de laboratorio que se emplea en el estudio de diversos aspectos biológicos como el desarrollo embrionario, fisiología y genómica. Es conocido que este organismo comparte hasta un 71% su genoma con el del ser humano, incluyendo 82% de genes asociados a enfermedades como el cáncer, Alzheimer, Parkinson y cardiopatías (Howe *et al.*, 2013).

Desde los últimos 20 años, el pez cebra ha surgido como un modelo vertebrado para estudios en genética, desarrollo embrionario y recientemente como modelo de

biomonitoreo y toxicidad de sustancias químicas, particularmente por su sensibilidad y capacidad de respuesta (Rocha *et al.*, 2011).

El pez cebra es un organismo que se ha convertido en uno de los principales modelos animales para la farmacología del comportamiento. De las principales ventajas del pez cebra es su capacidad para identificar compuestos que alteran la ansiedad. La nueva prueba de buceo Novel Tank es posiblemente una de las pruebas de comportamiento más comúnmente utilizadas para cuantificar respuestas de comportamiento similares a la ansiedad en el pez cebra.

Otras características que presenta este organismo son sus ventajas sobre otros bioindicadores como: una elevada tasa reproductiva, ciclo de vida corto y desarrollo embrionario, además de un corion transparente que permite la observación visual del desarrollo embrionario a través del tiempo (Lawrence, 2007).

El tiempo de desarrollo de este organismo es relativamente corto, ocurre en un periodo de 72 horas; desde la fecundación hasta la eclosión de una larva. En 1995, Kimmell (Kimmell *et al.*, 1995) describieron detalladamente el proceso de desarrollo embrionario, distinguiendo siete periodos y treinta y nueve etapas morfológicas específicas. En resumen, las siete etapas del desarrollo corresponden a una serie de procesos de división, migración celular y señalización, común en vertebrados. Mientras que las etapas tienen características morfológicas específicas del desarrollo del pez cebra.

Durante las etapas de 9, 24, 48 y 72 hpf (horas post fertilización) es posible observar a través de ciertas manipulaciones del embrión cambios morfológicos, que permiten hacer el seguimiento del desarrollo embrionario (Kimmell *et al.*, 1995; Haffter *et al.*, 1996)

Considerando condiciones de temperatura ideal (28°C) a las 9 hpf el embrión en periodo de gástrula debe presentar un 90% de formación de la gástrula, a través de una serie de movimientos conocidos como, epibolia. A las 24 hpf se debe distinguir la segmentación de las tres áreas: cabeza, torso y cauda. En la cabeza deben observarse los ojos y el otolito, en la zona del torso son visibles 26 somitas simétricas del mismo tamaño y forma, en la

región caudal se debe observar un muñón hacia la región terminal. En la parte ventral del embrión debe distinguirse una estructura esférica, rodeada por una delgada membrana también de forma esférica conocida como saco vitelino. Entre las 48 y 72 hpf el embrión debe aumentar su tamaño respecto a las 24 hpf. Las estructuras de cabeza, torso y cauda son más evidentes. La cabeza debe presentar claramente los ojos pigmentados (negros) y el otolito. La región caudal debe observarse separada del saco vitelino a las 48 hpf y a las 72 hpf la cola deber extenderse linealmente al resto del cuerpo de la larva, una vez que se rompe el corion. El saco vitelino debe conservar su aspecto esférico y en la región ventral superior se debe observar el corazón (Fig. 2).

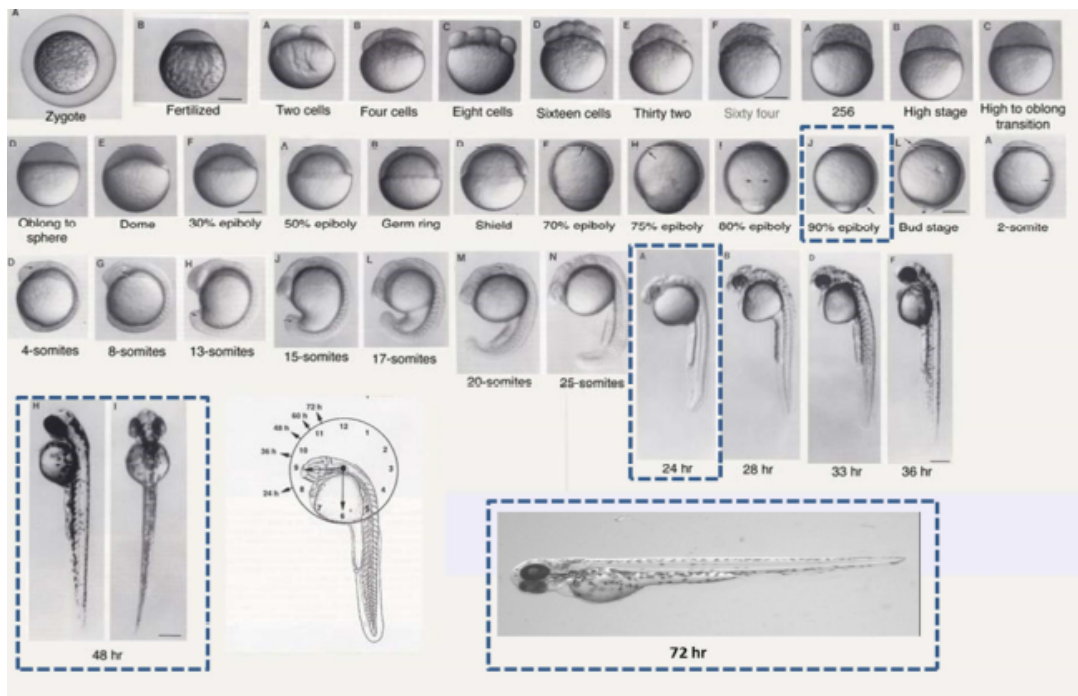


Figura 2. Desarrollo embrionario del pez cebra (*D. rerio*), tomado y modificado de Kimmel (Kimmel *et al.*, 1995) (---Principales etapas para la observación de cambios morfológicos durante el desarrollo embrionario)

Durante el desarrollo embrionario en etapas tempranas del pez cebra se han identificado al menos 374 genes esenciales, entre los que se incluyen diversos genes de la familia Hox, y elementos de respuesta a ácido retinoico (RARES, por sus siglas en inglés) (Golling *et al.*,

2002), lo que facilita el estudio de los efectos que provoca la exposición a contaminantes en esta etapa.

Una de las pruebas que permite vislumbrar los efectos por la exposición a sustancias tóxicas es la teratogénesis. 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. Se ha calculado que aproximadamente el 10% de defectos al nacimiento en humanos son causados por la exposición prenatal a sustancias teratogénicas ambientales (Rocha *et al.*, 2011). En este sentido el modelo de pez cebra ha tomado fuerza en la determinación de sustancias con potencial teratogénico, principalmente porque estas sustancias afectan etapas del desarrollo comunes en todos los animales y pueden representar una limitante en la vida adulta de los organismos.

JUSTIFICACIÓN

La creciente producción de plásticos y específicamente de BPA, conlleva a una gran cantidad de desechos en medios acuáticos donde los organismos quedan expuestos y susceptibles a los efectos del BPA, que a concentraciones altas se ha demostrado que es potencialmente dañino induciendo estrés oxidativo, así como alteraciones a nivel embrionario y neuronal en *Danio rerio*.

Es de gran importancia realizar una evaluación a concentraciones ambientalmente relevantes e identificar las posibles afectaciones en los organismos, ya que existe evidencia de la presencia de este contaminante en diversos ambientes acuáticos.

HIPÓTESIS

El BPA genera toxicidad en organismos acuáticos, induciendo estrés oxidativo y alterando la movilidad de *Danio rerio*, por lo tanto, es posible que al exponer a este organismo a concentraciones de ng/L se genere estrés oxidativo, embriotoxicidad, teratogenicidad y neurotoxicidad.

OBJETIVOS

General

Evaluar la toxicidad inducida por Bisfenol A en embriones y adultos de pez cebra (*Danio rerio*)

Específicos

- Evaluar el daño al desarrollo embrionario inducido por BPA sobre *Danio rerio*.
- Determinar el estrés oxidativo en larvas de *Danio rerio* a las 72 y 96 horas de exposición.
- Evaluar el comportamiento en adultos de *Danio rerio*.
- Determinar estrés oxidativo en cerebro de *Danio rerio*.

- Determinar la concentración de acetilcolinesterasa en cerebros de *Danio rerio*.

II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

2.1. Sustancia de prueba

El Bisfenol-A (2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane, 4,4'-Isopropylidenediphenol) utilizado en el estudio fue comprado a Merck (Darmstadt, Alemania), el grado de pureza estándar fue de $\geq 99\%$, $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$, con un peso molecular de 228.29 (Número CAS 80-05-7).

Cuantificación de BPA

Se siguió la metodología descrita por Wu et al., (2016). Las muestras de agua, incluyendo las soluciones de exposición fueron filtradas a través de una membrana de $0.45\mu\text{m}$ previo al análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Las muestras de cerebros fueron homogenizadas con $200\ \mu\text{L}$ de buffer de fosfatos (0.1 M pH 7.4), $100\ \mu\text{L}$ de internal standard de C-BPA ($200\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y $1\ \mu\text{L}$ de diclorometano en cada una de las muestras. Los homogenizados se centrifugaron a $16\ 000\ \times\ g$ por 10 min. $100\ \mu\text{L}$ del sobrenadante fueron transferidos a viales para el análisis de LC-MS/MS.

El contenido de BPA y C-BPA fueron determinados en el agua y en las muestras de cerebros usando el equipo HP Series 1260 high-performance liquid chromatograph (Agilent Technologies) y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo G6460 con ionización en electrospray (Agilent Technologies). Se utilizó una columna C18 la cual se mantuvo a 40°C con un flujo de $0.4\ \text{mL}/\text{min}$. La fase móvil inició con 40% de metanol grado HPLC y 60% de agua grado HPLC. El gradiente incrementó a 100% de metanol a los 7 min y se mantuvo durante 3 min. Se realizó un reequilibrio de 3 min antes de correr la

siguiente muestra. El gas drying estaba a 350°C a un flujo de 3 Lmin⁻¹ y el voltaje de capilaridad fue de 4.5 Kv. Los iones utilizados para los dos analitos se seleccionaron en función de su abundancia y su relación masa carga (m/z) como se muestra a continuación: 212.2 y 227.2 para BPA y 224.2 y 239.2 para C-BPA.

2.2. Obtención y mantenimiento de los organismos de prueba

Los organismos de prueba utilizados fueron peces cebra *Danio rerio*, obtenidos comercialmente y aclimatados en peceras de vidrio a razón de un pez por litro de agua y se aclimataron 6 semanas antes de comenzar el experimento. Las condiciones del medio fueron libre de cloros, filtrada con carbón, esterilizada con UV a temperatura de 28±1 °C y periodos de luz oscuridad natural de 12 horas, alimentados tres veces al día con hojuelas de espirulina (Ocean Nutrition) adicionadas con crustáceos en salmuera (*Artemia* sp. Nauplii) para inducir el desove.

2.3. Diseño experimental

2.3.1. En embriones de *Danio rerio*

La noche previa al desove se colocan machos y hembras (12 meses de edad) de tamaño 4-5 cm a razón de 2:1 en cámaras de reproducción individuales, el desove y fertilización se efectúa por la mañana por estimulación de la luz natural. Los embriones se recolectaron al tiempo de una hora (hpf), se realizó un lavado con agua y solución salina de acuerdo a los protocolos establecidos (Westerfield, 2007). Se realizó la clasificación de los embriones fertilizados en un microscopio estereoscópico, siguiendo lo descrito por (Kimmel *et al.*, 1995) siendo seleccionados aquellos que se encontraban en la etapa de blástula (2.5 hpf). Posteriormente se colocaron en placas con agua ultrapura a temperatura de 28±1°C hasta que alcanzaron la etapa de esfera (4 hpf).

2.3.1.1. Pruebas de toxicidad en embriones de *Danio rerio*

Siguiendo los parámetros de la (OECD, 2013) los embriones en etapa de esfera se colocaron en nueve placas de 24 pocillos (un embrión por pocillo), cada placa representó

una concentración de BPA más un grupo testigo, las concentraciones ambientalmente relevantes empleadas de BPA fueron de 220, 380, 540, 700, 860, 1180, 1340 y 1500 ngL⁻¹, las placas se mantuvieron en incubación a 28°C±1°C con periodos de luz/oscuridad natural de 12 horas, se realizó triplicado. Los criterios de valoración toxicológicos fueron evaluados y registrados, incluyendo la mortalidad embrionaria, eclosión, frecuencia cardíaca y tasa de malformaciones a los diferentes tiempos de 12, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a BPA, tomando como referencia el desarrollo normal del embrión de (Kimmel *et al.*, 1995). Las malformaciones se expresaron como porcentaje de embriones con al menos una malformación en comparación con el grupo testigo y asignando puntuaciones según la escala de (Hermsen *et al.*, 2011). Se construyeron los gráficos mostrando las principales malformaciones que fueron inducidas por la exposición a BPA utilizando el software IBM SPSS Statistics 22. También se tomó en cuenta la letalidad en los embriones durante los diferentes tiempos de exposición, extrayendo de las placas aquellos que estuvieran coagulados o no presentaran latido de corazón, al tiempo de 96 h se realizó el recuento de organismos vivos, muertos y malformados para llevar a cabo el análisis de regresión lineal de máxima verosimilitud y calcular la concentración letal 50 (CL50) y la concentración efectiva de malformaciones (CE50) a intervalos de confianza de 95% (p<0.05).

2.3.1.2. Evaluación de estrés oxidativo por exposición a BPA sobre larvas de *Danio rerio*

Se formaron nueve grupos de ovocitos de 1 g cada uno considerándose la tasa de mortalidad de cada grupo, posteriormente ocho de estos grupos se expusieron a concentraciones ambientalmente relevantes de BPA (220, 380, 540, 700, 860, 1180, 1340 y 1500 ngL⁻¹) y un grupo testigo. Los sistemas se mantuvieron a temperatura constante de 28°C±1°C hasta llegar a las 72 y 96 hpf, tomándose la mitad de organismos ya eclosionados para cada tiempo, se realizó un homogenizado de las larvas en solución buffer de fosfatos (PBS pH 7,4). A los homogenizados se les determinó HPC (Levine *et al.*,

1994), PCC (Parvez and Raisuddin, 2005; Burcham, 2007), LPX (Jiang, Hunt and Wolff, 1992); así como la actividad de las enzimas SOD (Misra and Fridovich, 1972), CAT (Radi *et al.*, 1991) y GPX (Tibor, 1998). El estudio se realizó por triplicado.

2.3.2. En adultos de *Danio rerio*

Los sistemas para la exposición a BPA fueron diseñados tomando en cuenta lo establecido por Orozco-Hernández *et al.*, 2021. Los organismos fueron colocados en peceras de vidrio de 18 L con aireación continua, periodos de luz/oscuridad natural de 12 horas y alimentación diaria. Posteriormente, treinta organismos fueron expuestos a tres concentraciones ambientales de BPA C1=220 C2=1180 y C3=1500 ngL⁻¹ durante 96 horas, siguiendo las indicaciones de la norma OCDE (No. 203). Se realizaron cambios de agua cada 24 horas restableciendo las concentraciones de BPA.

Después de las 96 horas de exposición se procedió a colocar a los organismos en peceras individuales para realizar las pruebas de comportamiento. Posteriormente, fueron sacrificados y diseccionados siguiendo lo estipulado por AVMA Guidelines on Euthanasia 2020 edition para la obtención de los cerebros.

Se colocaron pulls de treinta cerebros por cada concentración además de un grupo control en tubos eppendorf que contenían 1.5 mL de buffer de fosfatos (PBS pH=7.4). Se almacenaron los tubos en refrigeración a -80°C para su posterior utilización y con ello determinar estrés oxidativo y acetilcolinesterasa. El estudio se realizó por triplicado.

2.3.2.1. Prueba de comportamiento Novel Tank en adultos de *Danio rerio*

La prueba Novel Tank Diving Test (NTDT) es una de las más recomendadas para determinar el comportamiento exploratorio y de ansiedad en el organismo *Danio rerio* (Bencan et al., 2009). Dicha prueba resulta favorable debido al análisis por medio de un software el cual permite la cuantificación de ciertos comportamientos, que de otro modo serían altamente subjetivos (Bencan et al., 2009; Egan et al., 2009). La prueba consistió en colocar al pez de forma individual y aleatoria en una pecera de 10 litros en un ambiente aclimatado a temperatura de 28 ± 1 °C. Durante 6 minutos se grabaron los movimientos con una cámara GigE montada frente al tanque experimental. Los videos fueron analizados por el programa ToxTrac, el cual nos permitió dividir la pantalla en dos zonas (top y bottom) y determinando así la distancia total recorrida (cm), el tiempo de permanencia en top y bottom (s), latencia (s), frecuencia de transiciones entre zonas y el tiempo de freezing (s) (Cachat et al., 2010).

2.3.2.2. Pruebas de estrés oxidativo en adultos de *Danio rerio*

Para la determinación de estrés oxidativo se homogenizaron los cerebros previamente extraídos con un rotor-stator homogenizer (Ultra-turrax, IKA, Germany). El homogenizado se dividió en dos tubos. El tubo 1 contenía 300 µL de homogenizado y 300 µL de ácido tricloroacético al 20%. Se centrifugó a 11495 rpm/15min con este tubo se evaluó el contenido de LPX, HPC y PCC. Por otro lado, el tubo 2 contenía 700 µL de homogenizado y fue centrifugado a 12500 rpm/15 min. Se evaluó el contenido de SOD, CAT, GPX y proteínas totales. En la tabla 3 se ilustra el procedimiento para ambos tubos.

Tabla 3. Pruebas de estrés oxidativo en cerebros de *Danio rerio*

Tube	Biomarker	Tube content	Quantification	Method
1	LPX	50 μ L supernatant, 450 μ L Tris-HCl 150 mM, 1 mL TCA-TCB	nM of reactive carbonyls 535 nm	(Buege and Aust, 1979)
	HPC	50 μ L supernatant, 900 μ L reaction mix	nM of malondialdehyde 560 nm	(Jiang et al., 1992)
	PCC	150 μ L precipitate, 150 μ L DNPH/HCl 10 Mm, 500 μ L ATC 20%, etanol:acetate de etilo 1:1	nM of cumene 366 nm	(Levine et al., 1994)
2	SOD	1 mL guanidine 6M, 50 μ L supernatant, 260 μ L carbonate buffer, 200 μ L adrenaline 30 Mm	U SOD 480 nm	(Misra and Fridovich, 1972)
	CAT	30 μ L supernatant, 420 μ L isolation buffer, 300 μ L H ₂ O ₂ 20 Mm	mM of H ₂ O ₂ 240 nm	(Radi et al., 1991)
	GPX	100 μ L supernatant, 290 μ L reaction buffer, 100 μ L H ₂ O ₂ 20Mm	U/L of GPx 340 nm	(Gunzler and Flohe-Clairborne, 1985)
	Total proteins	12 μ L reductase glutation, 13 μ L supernatant, 75 μ L distilled water, 1.25 mL Bradford reactive	mg protein 595 nm	(Bradford, 1976)

2.3.2.3. Determinación de acetilcolinesterasa

Para la determinación de acetilcolinesterasa se siguió la metodología propuesta por Ellman et al., (1961). Se tomó el pull de treinta cerebros por concentración extraídos previamente y se homogenizaron. Posteriormente se centrifugaron a 4°C durante 15 min a 10000 x g. En un tubo eppendorf se colocaron 0.4 mL del sobrenadante, 2.6 mL de buffer de fosfatos (pH=8.0-0.1 M) y 0.1 mL de 5,5 -dithiobis-2-nitrobenzoate (DTNB). Después se añadió acetilcolina yodada (ACTh) como sustrato y se realizaron las mediciones en un espectrofotómetro a 412 nm por cada minuto de la reacción. Con los datos obtenidos se calculó el contenido de acetilcolinesterasa.

2.4. Análisis estadístico

Los datos de alteración al desarrollo embrionario y efectos teratogénicos se examinaron mediante la prueba de Fisher a una significancia de $p < 0.05$, utilizando el software Sigmaplot 12.3. Los datos de estrés oxidativo se procesaron mediante un análisis de varianza bidireccional (ANOVA), considerando al tiempo y concentración como factores A y B respectivamente. Mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer se observaron las diferencias entre las medias a un límite de confianza de 95 %.

Los datos de comportamiento se analizaron por una prueba ANOVA de una vía seguida de prueba post hoc Student-Newman-Keuls, verificando la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos fueron procesados en el programa sigmaplot 12.3.

Los datos de los biomarcadores de estrés oxidativo y acetilcolinesterasa se examinaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de una prueba post hoc Student-Newman-Keuls.

3. RESULTADOS

3.1. Cuantificación de BPA en agua y tejido

Tabla 4. Concentraciones de BPA en agua después de la exposición a 96 h y las concentraciones de BPA y factor de bioconcentración (BCF) en cerebros de *Danio rerio* a las 96 h mediante un análisis LC-MS/MS.

Concentraciones de exposición (ng/L)	Cuantificación en agua posterior a la exposición (ng/L)	Concentraciones en cerebros de <i>Danio rerio</i> (ng/Kg)	
	96 h (n=3)	96 h (n=3)	BCF
Control	ND	ND	-

C1	219.032± 0.124	1879.462±64.432	8.580
C2	1179.323±4.643	7261.72±43.432	6.157
C3	1498.534±34.644	7671.332±23.544	5.119

3.2. Embriotoxicidad y teratogenicidad de embriones de *Danio rerio* a concentraciones ambientalmente relevantes de BPA a las 96 hpf.

La tabla 5 nos muestra el porcentaje de organismos muertos y malformados de las diferentes concentraciones al finalizar la exposición a BPA, podemos observar un incremento de la mortalidad y presencia de malformaciones en función de la concentración.

Tabla 5. Porcentaje de mortalidad y malformaciones en embriones de *Danio rerio* expuestos a BPA a concentraciones ambientalmente relevantes.

BPA concentration (ngL ⁻¹)	Number of embryos exposed	Normal	Dead (%)	Malformation	Malformations (%)
0	72	72	0	0	0
220	72	69	4.17	2	2.78
380	72	62	13.89	7	9.72
540	72	58	19.44	14	19.44
700	72	50	30.56	25	34.72
860	72	45	37.50	34	47.22
1180	72	40	44.44	37	51.39
1340	72	34	52.78	51	70.83
1500	72	29	59.72	56	77.78

Estos datos nos permitieron nos permitieron determinar la dosis letal 50 en embriones a una concentración de 1224.60 ng/L con intervalos de confianza de 95% (1084.56-1462.32), además de la concentración efectiva 50 de malformaciones de 987.77 ng/L con intervalos de confianza de 95% (903.76-1090.37) (Hamilton, Russo and Thurston, 1977).

Una vez obtenidas se dividió la CL_{50} entre la CE_{50} para obtener el valor del índice teratogénico (IT) el cual fue de 1.250 demostrando que se trata de un compuesto teratogénico al superar el valor de 1 (Weigt *et al.*, 2011).

La figura 3 representa el porcentaje de embriones normales, muertos y teratogénicos de *Danio rerio* al finalizar la exposición a BPA.

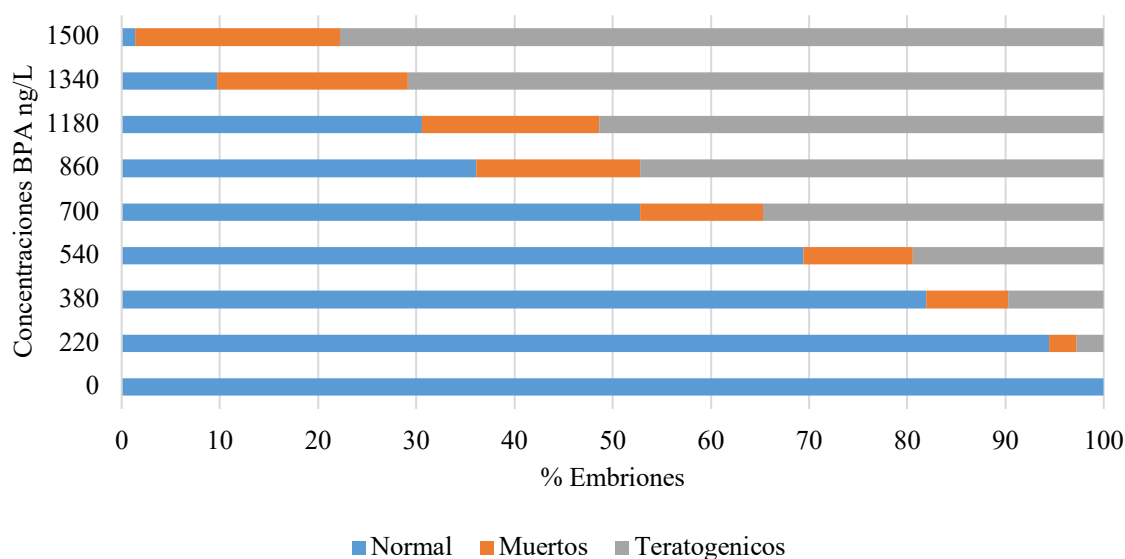


Fig 3. Porcentaje de embriones de *Danio rerio* normales, muertos y teratogénicos expuestos a BPA a concentraciones ambientalmente relevantes.

El porcentaje de embriones normales disminuye a medida que la concentración aumenta, el valor máximo de embriones normales se observa a la concentración de 220 ngL^{-1} con un 94.44% y el valor más bajo fue a la concentración de 1500 ngL^{-1} con un 1.38%. La tasa de mortalidad aumenta de un 2.77% para la concentración más baja hasta un 20.83% para la concentración más alta. Finalmente, el porcentaje de embriones teratogénicos aumentan en función de la concentración con un mínimo de 2.77% para la concentración más baja y un valor máximo para la concentración más alta de 51.38%.

3.3. Principales malformaciones en embriones de *Danio rerio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de BPA.

En la figura 4 podemos observar las diversas malformaciones que se lograron identificar durante la exposición de los embriones de *Danio rerio* a BPA, observándose un aumento en función de las concentraciones.

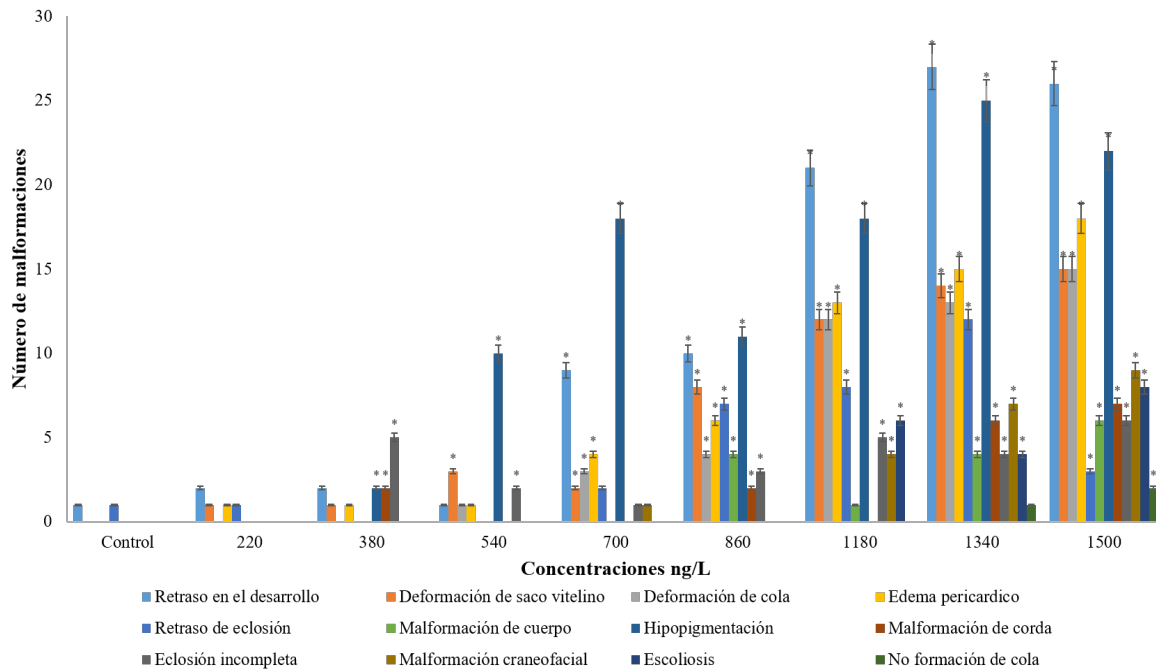


Fig 4. Malformaciones presentes en embriones de *Danio rerio* expuestos a BPA a concentraciones ambientalmente relevantes. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Las principales malformaciones que se identificaron fueron: retraso en el desarrollo, hipopigmentación, edema pericárdico, deformación de saco vitelino, deformación de cola, escoliosis, malformación craneofacial.

En la figura 5 observamos la disminución de las puntuaciones asignadas por (Hermsen *et al.*, 2011) al observar malformaciones durante los diferentes tiempos de exposición a 12, 24, 48, 72 y 96 h. A las 12 horas se puntuaron el desarrollo de ojos y cola. En el tiempo de 24 h se puntuaron el desarrollo de ojos y cola, la formación de somitas, movimiento y latido de corazón. Al tiempo de 48 h se sumó un punto al desarrollo de cola, pigmentación de ojos, pigmentación de cabeza y cuerpo, pigmentación de cola y circulación sanguínea. En el tiempo de 72 h se sumaron los puntos de formación de aleta pectoral, protuberancia bucal y eclosión. Finalmente, a las 96 h solo se suma un punto más a la eclosión. Siendo 16 la puntuación máxima para el desarrollo normal de un embrión.

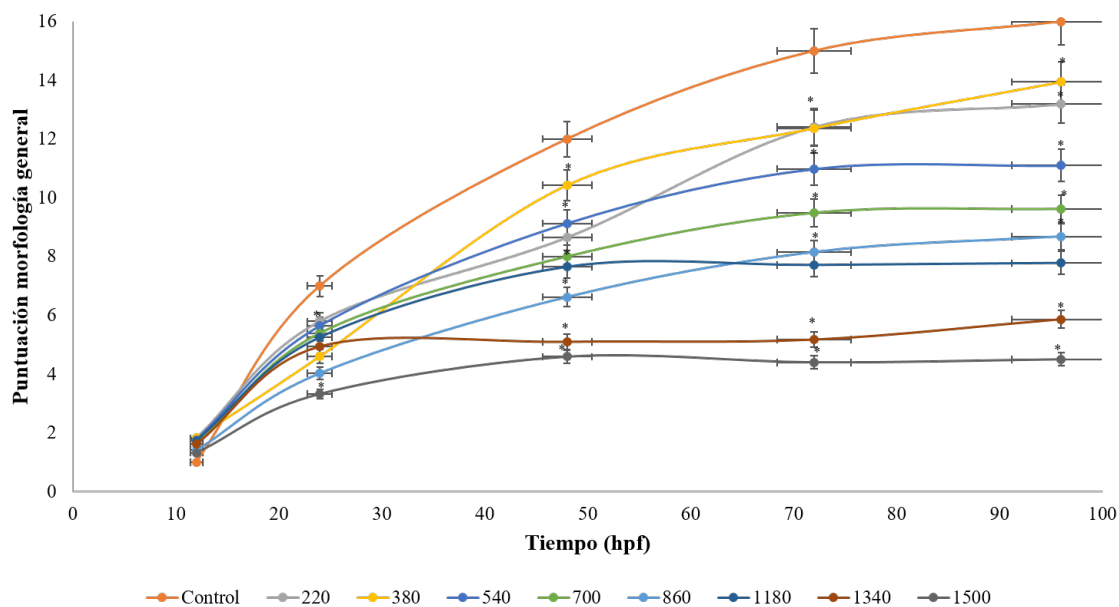


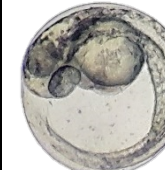






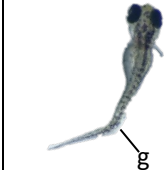


Fig 5. Puntuaciones de morfología general de embriones de *Danio rerio* expuestos a BPA a concentraciones ambientalmente relevantes.

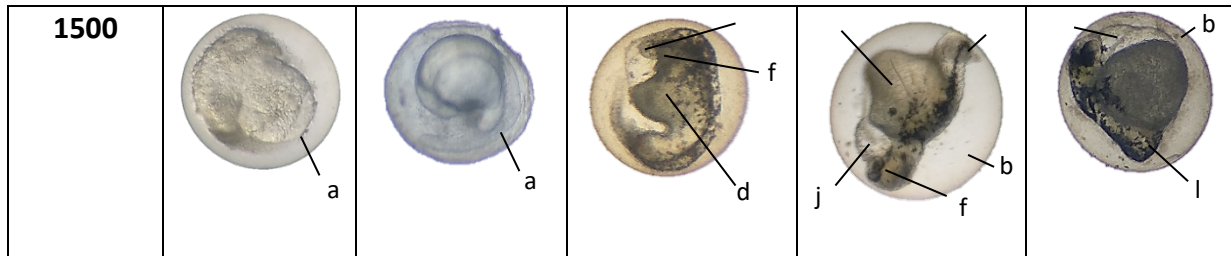
La figura 6 representa las malformaciones más representativas por concentración y a los diferentes tiempos de exposición. Observamos un desarrollo normal del grupo control en

todos los tiempos de exposición. A las 12 h las malformaciones presentes están relacionadas con el desarrollo ocular y de la cola y en algunos casos podemos determinar un retraso en el desarrollo al no presentar estas características. A las 24 horas se observaron la pigmentación, latido de corazón y movimiento. A las 48 h circulación sanguínea, pigmentación de cabeza y cola. A las 72 h circulación sanguínea, pigmentación de cabeza y cola. A las 72 h eclosión, formación de aleta pectoral y protuberancia bucal y al tiempo de 96 h se verifica que los embriones no hayan tenido un retraso en la eclosión.

Podemos observar que a medida que aumenta la concentración las malformaciones son más severas para los organismos, a concentraciones bajas se presentan; retrasos en el desarrollo, malformaciones de saco vitelino y cuerpo, mientras que a concentraciones mayores se pueden observar; malformaciones de cola, cráneo, edemas pericárdicos y de saco vitelino e incluso no llegan a desarrollarse extremidades como la cola, aletas o cabeza.

ng/L	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Control					
220					

380					
540					
700					
860					
1180					
1340					



a: retraso en el desarrollo, b: retraso en la eclosión, c: eclosión incompleta, d: deformación de saco vitelino, e: malformación de cuerpo, f: malformación craneofacial, g: deformación de cola, h: hipopigmentación, i: escoliosis, j: edema pericárdico, k: malformación de corda, l: sin formación de cola.

Fig 6. Principales malformaciones presentes en embriones de *Danio rerio* expuestos a BPA a concentraciones ambientalmente relevantes.

3.4. Evaluación de estrés oxidativo en embriones de *Danio rerio* a concentraciones ambientalmente relevantes de BPA a las 72 y 96 h.

La figura 7 nos muestra los biomarcadores utilizados para determinar estrés oxidativo: SOD, CAT, GPX, LPX, HPC y PCC en larvas de *Danio rerio* a las 72 y 96 horas de exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de BPA.

Para la actividad enzimática de SOD se observa diferencia significativa en todas las concentraciones respecto al grupo testigo ($p < 0.05$), también se observa la mayor actividad a la concentración de 860 ngL⁻¹ y una posterior disminución al aumentar las concentraciones. Al comparar los dos tiempos, en cada concentración se observa que la actividad de SOD disminuye a las 96 horas de exposición.

En el caso de la actividad de CAT observamos que la actividad aumenta en función a las concentraciones teniendo diferencia significativa respecto al testigo ($p < 0.05$), con una mayor actividad en la concentración de 1500 ngL⁻¹. Se observa que la actividad de CAT aumenta a las 96 horas en todas las concentraciones.

La actividad de GPX se ve disminuida conforme aumentan las concentraciones y teniendo diferencia significativa respecto al grupo testigo ($p < 0.05$). Se observa una disminución de la actividad a las 96 horas.

Para LPX se observa el contenido de malondialdehído (MDA) que representa el grado de lipoperoxidación, donde se observó un incremento significativo para todas las concentraciones respecto al testigo ($p < 0.05$). Se observa un aumento a las 96 horas.

Para HPC se observa un incremento significativo en todas las concentraciones respecto al grupo testigo ($p < 0.05$), teniendo la mayor presencia a la concentración de 1500 ngL^{-1} . Se observan incrementos al tiempo de las 96 horas.

En el caso de PCC se tiene un aumento significativo en todas las concentraciones respecto al grupo testigo ($p < 0.05$), observándose la mayor presencia en la concentración de 1500 ng/L . Se observa un incremento al tiempo de 96 horas en todas las concentraciones.

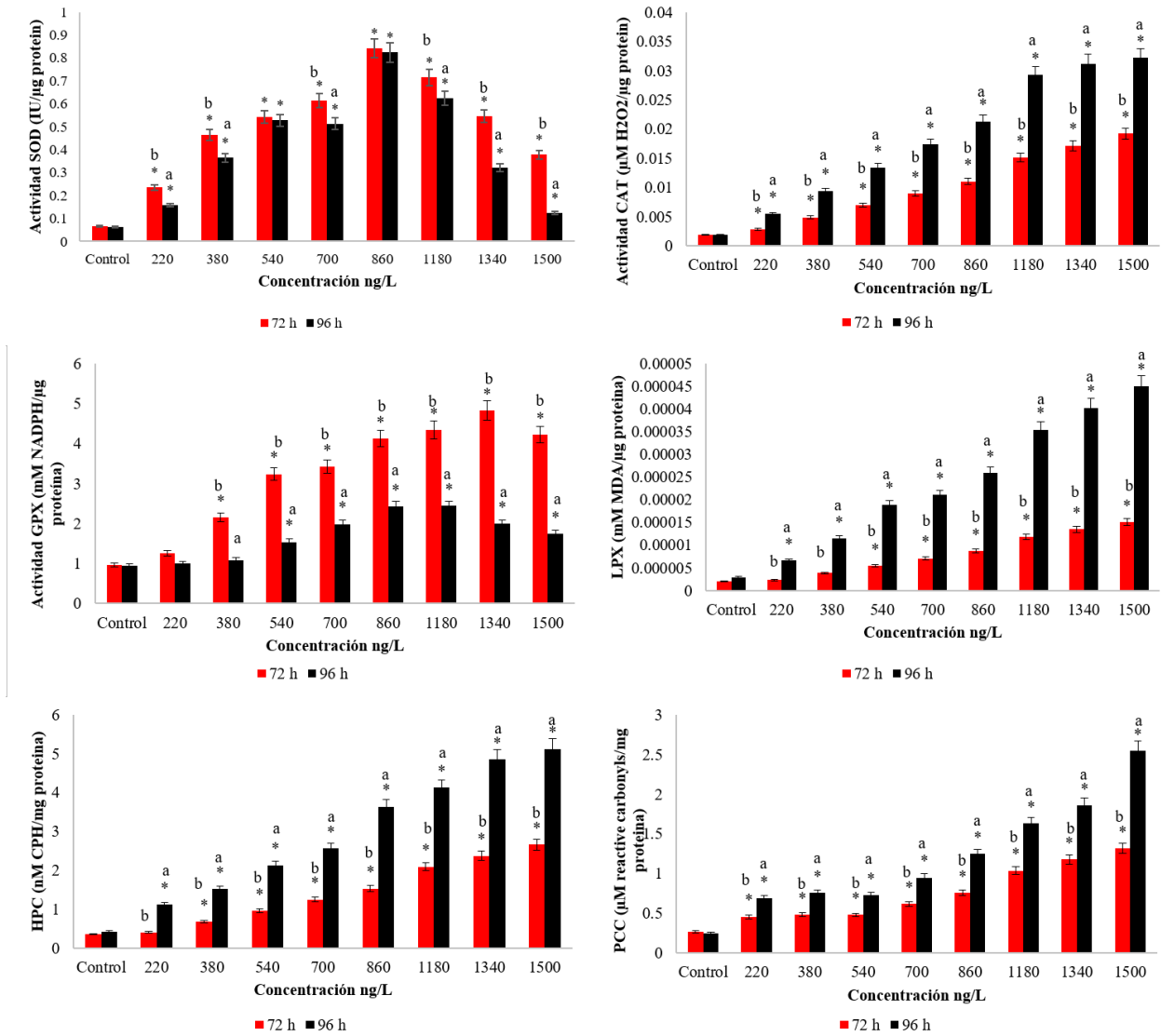


Fig 7. Biomarcadores de estrés oxidativo en larvas de *Danio rerio* expuestas a BPA a concentraciones ambientalmente relevantes.

3.5. Pruebas de comportamiento en adultos de *Danio rerio*

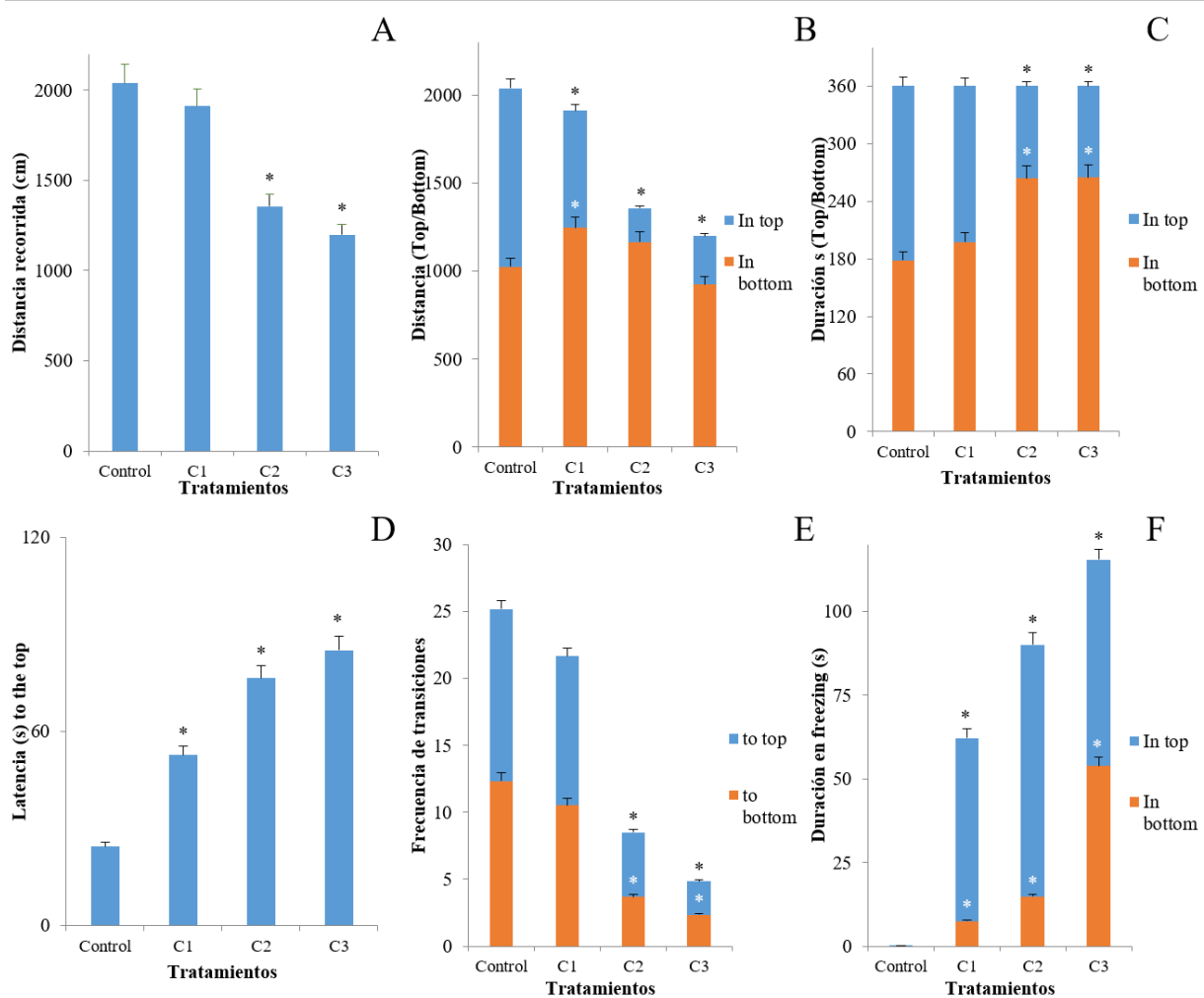


Fig 8. Parámetros de comportamiento (A=Distancia recorrida, B=Distancia en top/bottom, C=Tiempo en top/bottom, D=Latencia, E=Frecuencia de transiciones, F=Freezing) en *Danio rerio* adultos a las 96 h de exposición a concentraciones ambientales de BPA (C1=220, C2=1180, C3=1500 ngL⁻¹) al tiempo de 96 h. Valores expresados como media \pm SEM, n=30 por grupo. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto al grupo control (p<0.05), mediante una comparación múltiple post hoc Student-Newman-Keuls.

En la figura 8 observamos cambios en el comportamiento de nado en *Danio rerio* al ser expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de BPA. Donde observamos disminuciones significativas en la distancia total recorrida (TD), La frecuencia de transiciones de top>bottom (Ttb) y bottom>top (Tbt) Tbt respecto al grupo control. Por otro lado, se observaron aumentos significativos en la distancia recorrida en top (Dtop), bottom (Dbott), en el tiempo de duración en top (Ttop), bottom (Tbott), latencia (Lty) y freezing (Fz) respecto al grupo control.

3.6. Biomarcadores de estrés oxidativo en cerebros de *Danio rerio*

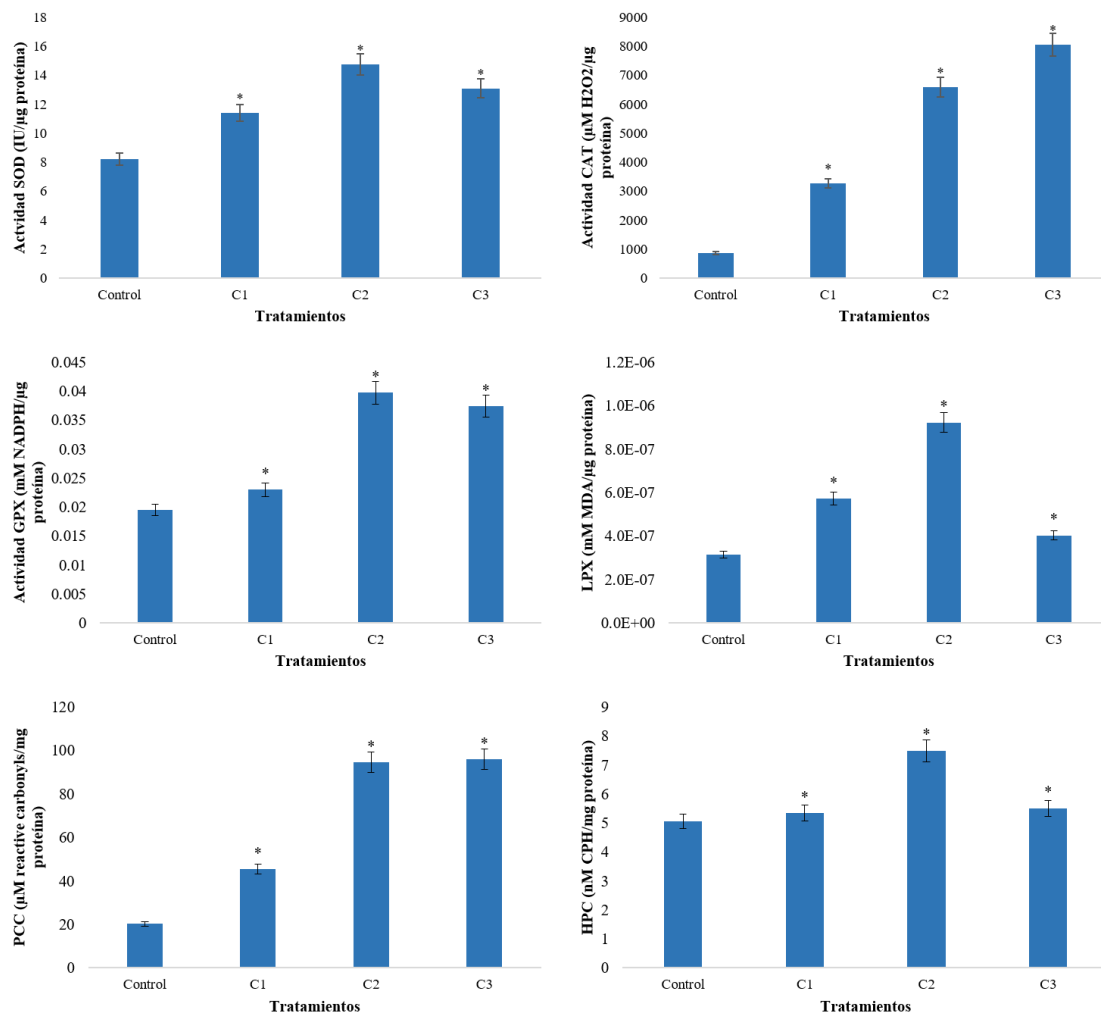


Fig 9. Biomarcadores de estrés oxidativo en cerebros de *Danio rerio* adultos expuestos a concentraciones ambientales de BPA (C1=220, C2=1180, C3=1500 ngL⁻¹) al tiempo de 96 h. Valores expresados como mediana \pm rango, n=30 por grupo. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto al grupo control ($p<0.05$), mediante una comparación múltiple post hoc Student-Newman-Keuls.

En la figura 9 podemos observar los biomarcadores empleados para la determinación de estrés oxidativo en cerebros de *Danio rerio* adultos, teniendo diferencias significativas en las tres concentraciones respecto al grupo control. En el caso de SOD observamos aumentos significativos respecto al grupo control en las tres concentraciones, siendo C2 la mayor presencia de SOD mientras que C1 fue la de menor expresión de este biomarcador. En el caso de CAT se tienen aumentos significativos en las tres concentraciones teniendo una mayor expresión en la concentración más alta C3 y la expresión más baja en C1. Para GPX también se observan aumentos significativos respecto al grupo control, teniendo mayor diferencia en C2. En LPX observamos diferencias significativas en las tres concentraciones teniendo mayor presencia de lipoperoxidos en C2. En PCC observamos aumentos significativos respecto al grupo control en las tres concentraciones, siendo C3 donde tenemos mayor presencia de proteínas carboniladas. En el caso de HPC no se observó diferencia significativa en C1, sin embargo, en C2 y C3 si hubo aumentos significativos respecto al control ($p<0.05$).

3.7. Determinación de acetilcolinesterasa (AChE) en cerebros de *Danio rerio*

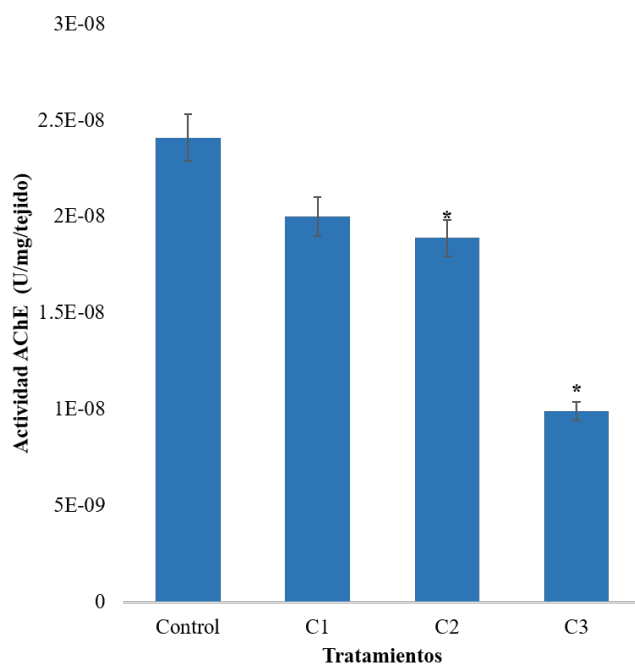


Fig 10. Determinación de acetilcolinesterasa (AChE) en cerebros de *Danio rerio* adultos expuestos a concentraciones ambientales de BPA (C1=220, C2=1180, C3=1500 ngL⁻¹) al tiempo de 96 h. Valores expresados como mediana \pm rango, n=30 por grupo. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$), mediante una comparación múltiple post hoc Student-Newman-Keuls.

En la figura 10 observamos la determinación de AChE en cerebros de *Danio rerio* adultos después de ser expuestos a tres concentraciones de BPA, podemos observar una disminución significativa en C2 y C3 en la presencia de AChE respecto al grupo control (H

(3) = 20.748; n = 30; p < 0.001). Estos resultados sugieren que el BPA puede causar inhibición de la actividad de AChE y conducir a una neurotoxicidad.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Embriones de *Danio rerio*

Como se ha observado en los resultados de este experimento, el BPA ha tenido efectos sobre el desarrollo embrionario de *Danio rerio* generando malformaciones. Además, de inducir estrés oxidativo a las 72 y 96 h de exposición. La tabla 4 nos permite observar la mortalidad que generó el BPA a concentraciones que se han encontrado en medios acuáticos, calculando; la CL50 a concentración de 1224.60 ngL⁻¹, la CE50 a 987.77 ngL⁻¹ y con ello el IT el cual fue de 1.250. Por lo tanto, el BPA se puede considerar un compuesto con potencial teratógeno (Hamilton, Russo and Thurston, 1977). En el estudio de (Wolkowicz, Herkovits and Pérez Coll, 2014) el índice teratogénico en *Rhinella arenarum* fue de 4.7 en etapas tempranas de desarrollo del embrión. Por otro lado, (Moreman *et al.*, 2017) reportan un índice teratogénico en *Danio rerio* de 2.1, empleando concentraciones de mgL⁻¹. Si bien, predominaron las malformaciones otro punto a tomar en cuenta es la letalidad que originó este compuesto a concentraciones de ng/L. Lo cual, podría estar relacionado a un mecanismo de estrés oxidativo (EO) y a la fuerte afinidad del BPA a los receptores celulares estrogénicos como la GPR30; los cuales alteran la metilación y la expresión de los genes que se encuentra relacionados a la carcinogénesis y la mutagénesis, como lo describe (Seachrist *et al.*, 2016).

La incidencia de malformaciones está en función del tiempo, es decir, a menor concentración se encontraron menor número de malformaciones; mientras que a mayor concentración se pudieron observar mayor número de malformaciones. Lo cual queda ilustrado en la figura 4, donde además se observa que las malformaciones que predominan son el retraso en el desarrollo, hipopigmentación y edema pericárdico en todas las concentraciones. (Sahoo *et al.*, 2020) mencionan que el BPA a concentraciones bajas (ng/L) tiene la capacidad de alterar las respuestas celulares en diferentes tejidos de los organismos y con ello generar especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales terminan desencadenando estrés oxidativo. Por otro lado (Wu *et al.*, 2011; Ferguson *et al.*, 2016; Kim and Hong, 2017) relacionaron una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes con la exposición a BPA. Además, indicaron que el BPA originaba daño a macromoléculas, como los lípidos y el DNA.

Uno de los mecanismos por los cual se genera una alteración en el desarrollo de los embriones puede explicarse por el daño oxidativo generado al DNA, el cual se encuentra involucrado en la síntesis de proteínas y la organogénesis en etapas tempranas del desarrollo (Zhang *et al.*, 2020). Las especies reactivas del tipo anión superóxido (O_2^*) y radicales hidroxilos ($*OH$) tienen afinidad a sitios moleculares con alta densidad electrónica y pueden abstraer protones de estructuras moleculares definidas, desencadenando reacciones de propagación y generando ROS secundarias (Valavanidis *et al.*, 2006; Zaremba and Oliński, 2010).

Es importante conocer cómo se generan ROS por la presencia de BPA. Es posible que el BPA mediante la unión a receptores celulares origine una respuesta celular bloqueando

las líneas de señalización (Zhang and Liu, 2018; Wang, Zhao and Ji, 2019). En concordancia con lo anterior, (Vauti *et al.*, 2020) menciona que durante las etapas tempranas de desarrollo embrionario la señalización de genes es crucial para la proliferación celular. Además de que esta señalización puede verse afectada por la presencia de xenobióticos que generan radicales libres del tipo O_2^* y OH^* en respuesta (El-Demerdash *et al.*, 2018). Otro proceso de generación de ROS es través de los procesos de eliminación del BPA, el cual se biotransforma en BPA-glucoronido por acción del citocromo P450. Es sabido que en los procesos de biotransformación se generan especies radicalarias por acción de las monooxigenasas e incluso durante la fosforilación oxidativa durante la respiración normal de la célula (Matthews, Twomey and Zacharewski, 2001; Völkel *et al.*, 2002; Geens *et al.*, 2012; Mileva *et al.*, 2014).

La figura 7 nos muestra los biomarcadores de estrés oxidativo. Observándose una disminución en enzimas antioxidantes SOD y CAT y un aumento en GPX, LPX, HPC y PCC, traducido como daño oxidativo. Autores como (Wang *et al.*, 2013) reportan la generación de ROS por exposición a BPA así como una disminución de especies antioxidantes, afectando la locomoción en larvas de *Danio rerio*.

El aumento de las enzimas SOD y CAT durante los primeros tiempos de exposición indica una respuesta antioxidante del organismo siendo la primera línea de defensa contra radicales libres (Köktürk, Alak and Atamanalp, 2020) . El proceso conlleva en una primera parte a la eliminación de O_2^* y H_2O_2 antes de formarse OH^* . SOD es la encargada de eliminar O_2^* y con ello se da la formación de H_2O_2 (Bourque *et al.*, 2008). (Bray *et al.*, 1974) explican el mecanismo en el que SOD se ve inactivada por la presencia de un exceso

de H₂O₂, donde sugiere que el peróxido daña el residuo de histidina que es fundamental para la activación de SOD por parte de la enzima nativa. (Gauron *et al.*, 2016) mencionan que H₂O₂ se encuentra presente durante el desarrollo embrionario de *Danio rerio* y que CAT y GPX son las principales responsables de controlar la presencia del peróxido, sin embargo, observamos una disminución posterior a las 48 h para CAT y un aumento significativo de hidroperóxidos, dicha disminución enzimática se debe a una sobreproducción de especies reactivas .

Por el contrario, observamos un aumento de la enzima GPX. Esta enzima es la encargada de catalizar al H₂O₂. Donde se involucra su forma reducida GSH a su forma oxidada GSSG. Es sabido que GPX también brinda protección a las membranas celulares contra la lipoperoxidación (Van der Oost, Beyer and Vermeulen, 2003). En este estudio observamos un aumento de lipoperoxidación en los dos tiempos de exposición, además la Fig 6 nos permite observar que las concentraciones más altas de 1180, 1340 y 1500 ngL⁻¹ fueron en las que se obtuvo un mayor grado de lipoperoxidación.

Finalmente observamos un aumento de LPX, HPC y PCC, los cuales tienen afectación sobre membranas celulares, señalización de la célula y daños a cadenas de DNA y proteínas (Klaunig, Kamendulis and Hocevar, 2010; Gassman *et al.*, 2015). Relacionándose con el desarrollo del embrión de *Danio rerio*, al mostrar diversas malformaciones.

La figura 5 nos muestra las puntuaciones asignadas por (Hermsen *et al.*, 2011) para el desarrollo embrionario de *Danio rerio*. Dichas puntuaciones se asignan en función de las características de crecimiento normal de un embrión (Kimmel *et al.*, 1995). Siendo el

grupo control el que mayor puntuación alcanza con 16 y el que menor puntuación tuvo fue la concentración de 1500 ngL⁻¹ con 4.2, como se mencionó previamente las ROS se encuentran involucradas en el crecimiento. Por lo tanto, las concentraciones más altas de BPA generan un mayor desbalance en la homeostasis interna de las células (Wu *et al.*, 2011). Autores como (Ge *et al.*, 2021) relacionan al BPA con daño genético y con ello apoptosis celular y malformaciones durante el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*.

La figura 4 detalla los principales tipos de malformaciones encontradas por concentración a través del tiempo. El grupo control tuvo un desarrollo normal hasta las 96 h.

En la concentración de 220 ngL⁻¹ se observa: deformación de cola, eclosión incompleta y retraso en el desarrollo. (Buckles *et al.*, 2004; Knippschild *et al.*, 2005) reportan que las proteínas del tipo Wnt3a y caseína quinasa1 (CK1) y 2 se encuentran involucradas en el desarrollo embrionario de *Danio rerio*. las señales Wnt se traducen durante el desarrollo embrionario de *Danio rerio* en al menos dos vías; una canónica dependiente de catenina y una cascada dependiente de catenina. Estudios revelan que las caseínas quinasas participan durante la vía canónica de las Wnt (Sakanaka, Sun and Williams, 2000; Schwarz-Romond *et al.*, 2002; Knippschild *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2005), teniendo una expresión ubicua y de forma temporal (Buckles *et al.*, 2004). Los hallazgos indican que ambas proteínas participan en el desarrollo ocular, procesos que regulan la formación del eje dorso-central y específicamente desarrollo de cola. (Karimaian *et al.*, 2017) mencionan que ROS se encuentran involucradas en las vías de señalización de la Wnt afectando la función normal de la célula. Esta afectación se genera a partir de las interacciones de proteínas carboniladas, las cuales conducen a una reacción en cadena en las proteínas. En

el estudio de (Olsvik *et al.*, 2019) se muestra evidencia de la interacción que tiene el BPA sobre diversos genes de *Danio rerio*, específicamente sobre Wnt, reportando metilaciones sobre la estructura de estos genes. Por lo anteriormente mencionado podríamos explicar la presencia de: retraso en el desarrollo, deformaciones de cola y eclosiones incompletas.

En la concentración de 380 ngL⁻¹ y 540 ngL⁻¹ se observaron: edema pericárdico, deformación de saco vitelino, deformación de cuerpo y cola. La presencia de edemas pericárdicos puede deberse a la superhidratación del tejido atribuido a problemas de regulación osmótica (Hill *et al.*, 2004). Estudios como el de (Dong, Matsumura and Kullman, 2010) relacionan la expresión de ciclooxygenasas (COX-2) con un desarrollo normal del corazón como la aparición de fenotipos cardiovasculares aberrantes. (Huang *et al.*, 2012) reportan una sobre expresión de COX-2 por la exposición a BPA además de otros genes relacionados a la inflamación que tienen como consecuencia anomalías en los ventrículos del corazón de *Oryzias melastigma* en etapa embrionaria. En adición también se relacionan afectaciones al desarrollo de cuerpo por niveles anormales de COX-2.

En las concentraciones subsecuentes (700, 860, 1180, 1340 y 1500 ngL⁻¹) además de las malformaciones ya antes mencionadas, se observaron: hipopigmentación, no desarrollo de cola ni cabeza, hemorragias y deformación craneoencefálica. La melanina es biosintetizada a través de un proceso denominado melanogénesis, dicho proceso se lleva a cabo en una serie de reacciones enzimáticas donde la Tyrosina (Tyr) tiene gran relevancia para la generación de pigmentos (Gillbro and Olsson, 2011; Chang, 2012). Estudios como el de (Mu *et al.*, 2018, 2020) sugieren que el BPA es capaz de alterar la síntesis de melanina durante el desarrollo de *Danio rerio* mediante la reducción de la

expresión de los genes relacionados a la producción de este compuesto, lo cual se encuentra en concordancia con nuestro estudio. En el caso de la supresión de cabeza y cola. La etapa de organogénesis es crucial para el desarrollo de estas estructuras. El gen Wnt se relaciona con proliferación celular para el desarrollo de estructuras (Olsvik *et al.*, 2019), como se había revisado la señalización se ve afectada por la exposición a BPA. El desarrollo craneofacial en *Danio rerio* se encuentra regulado por una serie de genes como Wnt, Wnt9a, erizo sónico (Shh), además de proteínas como SOX y Alx1 y deubiquitinasas (Mork and Crump, 2015; B Lajis, 2018; LeCorgne *et al.*, 2018), dichas proteínas participan activamente para el desarrollo craneofacial regulando la migración y diferenciación celular de la cresta neural craneal (CNC) (Yan *et al.*, 2002; Tse, 2017). Estudios revelan que hormonas de estrógenos afectan el desarrollo del cartílago del embrión mostrando una estructura osea craneofacial irregular con una degradación significativa (He *et al.*, 2018), el BPA como disruptor endocrino podría estar involucrado en los procesos de señalización celular durante los procesos hormonales y con ello generar afecciones craneofaciales, existe escasa información acerca de mecanismos específicos para la explicación de estas afectaciones.

Los efectos mencionados previamente en esta investigación sobre embriones de *Danio rerio* han sido descritos en función de las concentraciones. Donde podríamos afirmar que a concentraciones ambientales el BPA posee un potencial dañino para los organismos.

4.2. Adultos de *Danio rerio*

De acuerdo a los resultados observados podríamos deducir que la exposición de *Danio rerio* a concentraciones ambientales de BPA tuvo un efecto neurotóxico en este organismo. Se observaron cambios en el comportamiento y presencia de radicales libres en cerebro, además de una disminución de acetilcolinesterasa en el mismo.

En la figura 8 se midieron los parámetros de comportamiento observando principalmente una disminución del movimiento (A, F) donde el organismo permaneció un mayor tiempo en el fondo del tanque (B). La disminución de la locomoción fue estudiada en larvas de *Danio rerio* (Gu *et al.*, 2019) y en adultos (Kim *et al.*, 2020) por la exposición a BPA y se debió principalmente a una afectación del SNC. Se sabe que el SNC está compuesto principalmente por fosfolípidos los cuales actúan como segundos mensajeros en los canales de neurotransmisión. Dichos fosfolípidos son vulnerables a la oxidación por la presencia de especies radicalarias como anión superóxido (O⁻²) (Paredes *et al.*, 2002). También (Sahoo *et al.*, 2020) informaron que la exposición a una concentración de 17,52 µM de BPA indujo una alteración en la escototaxis y en el comportamiento exploratorio. Además, hubo un aumento en; tiempo pasado en la zona superior, frecuencia de transiciones en la zona superior y disminución en la latencia para entrar a la zona superior. Mientras que en nuestro estudio observamos en la figura 8 (E) que el número de transiciones disminuyó, así como la latencia a medida que aumentamos la concentración de BPA. En lo reportado por Sahoo *et al.*, 2020 para validar la respuesta neuroconductual alterada por BPA, reportaron resultados de estrés oxidativo en cerebro de pez cebra. Hallaron que la generación de radicales libres durante la exposición a BPA esta directamente asociada con la disminución de la actividad de glutatión reductasa (GR) que

conduce a un bajo nivel de glutatión (GSH) siendo la forma reducida de GPX, en cerebro de pez cebra. Dado que se requiere un equilibrio dinámico entre la producción de GSH y su oxidación para un entorno celular sostenible, el papel de la glutatión reductasa es vital para controlar la inducción del estrés oxidativo (Gao et al., 2018). En la figura 9 se observa un aumento de la presencia de GPX en cerebro en función de la concentración con aumentos significativos respecto al grupo control. En C3 se aprecia que existe una disminución en la presencia de GPX en respuesta a la presencia de especies radicalarias. Se sugiere que el mecanismo de defensa contra la oxidación se ha disminuido en concentraciones mayores. El cerebro al ser un órgano de alto consumo de energía y rico en lípidos lo hace susceptible a la oxidación por presencia de radicales libres. Chen et al., determinaron que la expresión de genes se encuentra relacionada con problemas de locomoción y neurotoxicidad en *Danio rerio*. Lo que refiere a la señalización colinérgica se puede decir que la presencia de acetilcolinesterasa es fundamental para regular la función cerebral normal del pez cebra (Hanneman 1989; Morley, 2005). Aunado a esto los niveles de AChE también se vieron afectados por la exposición a BPA pudiendo generar afectaciones, ya que la AChE participa activamente en la modulación de las funciones motoras y cognitivas (Discroll et al., 2009).

La AChE se encarga de hidrolizar la acetilcolina (ACh) para dar lugar a colina y acetato (Behra et al., 2002), al existir una disminución de AChE se esperaría una mayor presencia de acetilcolina en la hendidura neuronal (Tufi et al., 2016) afectando así la sinapsis entre neuronas. En la figura 10 se observa una disminución significativa de AChE lo que sugiere una mayor presencia de acetilcolina. Luo et al., 2013 reportan que la actividad de AChE se

encuentra relacionada con parámetros de comportamiento en ratones ante la exposición a BPA. Observaron que la exposición prolongada disminuía la presencia de AChE en el hipocampo y con ello se veía modificado el comportamiento generando ansiedad. En el estudio de Chen et al., 2017 también observaron una disminución de AChE en cerebros de *Danio rerio* por la exposición a BPA, aumentando así los niveles de acetilcolina generando una afectación en la señalización y con ello una contracción muscular anormal y comportamiento de natación. Concluyeron que este compuesto era capaz de afectar la presencia de esta enzima mediante mecanismos indirectos. En el estudio de Gou 2019 la disminución de AChE fue debido a la presencia de BPA afectando la locomoción en larvas de *Danio rerio*. Nuestros resultados indican que la disminución de los niveles de AChE están teniendo una influencia sobre el comportamiento de *Danio rerio* al disminuir la movilidad y generar ansiedad ante la disminución de transiciones en la prueba novel tank.

5. CONCLUSIONES

El BPA indujo estrés oxidativo con el aumento de LPX, HPC y PCC, además de la disminución de SOD y GPX. Observamos diversas malformaciones, predominando; retraso en el desarrollo, hipopigmentación y edemas de corazón y saco vitelino. Se pudo determinar el IT considerándose un compuesto teratogénico. El BPA es un compuesto embriotóxico al aumentar la letalidad en los embriones en función de la concentración. También, por los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que la exposición de *Danio rerio* adultos a concentraciones ambientalmente relevantes de BPA generan neurotoxicidad en este organismo, al verse afectada la locomoción, presencia de estrés oxidativo y una disminución de acetilcolinesterasa.

Esta investigación nos permite alertar sobre los potenciales efectos dañinos que posee el BPA a concentraciones que se encuentran en el medio ambiente.

6. REFERENCIAS

Alonso-Magdalena, P. *et al.* (2012) 'Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways', *Molecular and Cellular Endocrinology*. doi:

10.1016/j.mce.2011.12.012.

Arellano-Aguilar, O. (2018) 'Contaminación del agua y sus efectos ecológicos', in, p. 151.

Auta, H. S., Emenike, C. U. and Fauziah, S. H. (2017) 'Distribution and importance of microplastics in the marine environmentA review of the sources, fate, effects, and potential solutions', *Environment International*. doi: 10.1016/j.envint.2017.02.013.

B Lajis, A. F. (2018) 'Systematic review on the effect of chemical compounds on craniofacial development of a zebrafish embryo', *Journal of Bioinformatics and Systems Biology*. doi: 10.26502/jbsb.5107001.

Battocletti, A. (2011) 'Toxicidad crónica de los plásticos', *Tendencias en Medicina*.

Bhagat, J. *et al.* (2021) 'Effects of nanoplastic on toxicity of azole fungicides (ketoconazole and fluconazole) in zebrafish embryos', *The Science of The Total Environment*, 800, p. 149463. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149463.

Bossingham, M. J., Carnell, N. S. and Campbell, W. W. (2005) 'Water balance, hydration status, and fat-free mass hydration in younger and older adults', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(6), pp. 1342–1350. doi: 10.1093/ajcn/81.6.1342.

Bourque, S. L. *et al.* (2008) 'Perinatal iron deficiency affects locomotor behavior and water maze performance in adult male and female rats', *Journal of Nutrition*. doi:

10.1093/jn/138.5.931.

- Braun, J. M. and Hauser, R. (2011) 'Bisphenol A and children's health', *Current Opinion in Pediatrics*. doi: 10.1097/MOP.0b013e3283445675.
- Bray, R. C. *et al.* (1974) 'Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide', *Biochemical Journal*. doi: 10.1042/bj1390043.
- Buckles, G. R. *et al.* (2004) 'Combinatorial Wnt control of zebrafish midbrain-hindbrain boundary formation', *Mechanisms of Development*. doi: 10.1016/j.mod.2004.03.026.
- Burcham, P. C. (2007) 'Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: A new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury', *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. doi: 10.1016/j.vascn.2006.02.015.
- Chang, T. S. (2012) 'Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity', *Materials*. doi: 10.3390/ma5091661.
- Chávez-Mejía, A. C. *et al.* (2008) 'DETECCIÓN DE MICROCONTAMINANTES ORGANICOS EN EL AGUA RESIDUAL DE LA CIUDAD DE MEXICO'.
- Cole, M. *et al.* (2011) 'Microplastics as contaminants in the marine environment: A review', *Marine Pollution Bulletin*. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
- Diamanti-Kandarakis, E. *et al.* (2009) 'Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement', *Endocrine Reviews*. doi: 10.1210/er.2009-0002.
- Dodds, E. C. and Lawson, W. (1936) 'Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus [10]', *Nature*. doi: 10.1038/137996a0.
- Dong, W., Matsumura, F. and Kullman, S. W. (2010) 'TCDD induced pericardial edema and relative Cox-2 expression in medaka (*Oryzias Latipes*) embryos', *Toxicological Sciences*. doi: 10.1093/toxsci/kfq254.
- Eid, J. I., Eissa, S. M. and El-Ghor, A. A. (2015) 'Bisphenol A induces oxidative stress and DNA damage in hepatic tissue of female rat offspring', *The Journal of Basic & Applied Zoology*. doi: 10.1016/j.jobaz.2015.01.006.

- El-Demerdash, F. M. *et al.* (2018) 'Xenobiotics, oxidative stress, and antioxidants', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2018/9758951.
- van Esterik, J. C. J. *et al.* (2014) 'Programming of metabolic effects in C57BL/6JxFVB mice by exposure to bisphenol A during gestation and lactation.', *Toxicology*. Ireland, 321, pp. 40–52. doi: 10.1016/j.tox.2014.04.001.
- Ferguson, K. K. *et al.* (2016) 'Repeated measures analysis of associations between urinary bisphenol-A concentrations and biomarkers of inflammation and oxidative stress in pregnancy', *Reproductive Toxicology*. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.10.002.
- FitzGerald, R. E. and Wilks, M. F. (2014) 'Bisphenol A-Why an adverse outcome pathway framework needs to be applied', *Toxicology Letters*. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.05.002.
- Gassman, N. R. *et al.* (2015) 'Bisphenol a promotes cell survival following oxidative DNA damage in mouse fibroblasts', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0118819.
- Gauron, C. *et al.* (2016) 'Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development', *Developmental Biology*. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.05.004.
- Ge, Y. *et al.* (2021) 'Bisphenol A exposure induces apoptosis and impairs early embryonic development in *Xenopus laevis*', *Environmental Pollution*. doi: 10.1016/j.envpol.2021.116901.
- Geens, T. *et al.* (2012) 'A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A', *Food and Chemical Toxicology*. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.059.
- Geyer, R., Jambeck, J. R. and Law, K. L. (2017) 'Production, use, and fate of all plastics ever made', *Science Advances*. doi: 10.1126/sciadv.1700782.
- Gillbro, J. M. and Olsson, M. J. (2011) 'The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - Existing and new approaches', *International Journal of Cosmetic Science*. doi: 10.1111/j.1468-2494.2010.00616.x.
- Golling, G. *et al.* (2002) 'Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes

essential for early vertebrate development', *Nature Genetics*, 31(2), pp. 135–140. doi: 10.1038/ng896.

Gu, J. *et al.* (2019) 'Neurobehavioral effects of bisphenol S exposure in early life stages of zebrafish larvae (*Danio rerio*)', *Chemosphere*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.218.

Gundert-Remy, U. *et al.* (2017) 'Bisphenol A (BPA) hazard assessment protocol', *EFSA Supporting Publications*. doi: 10.2903/sp.efsa.2017.en-1354.

Haffter, P. *et al.* (1996) 'The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*', *Development*. The Company of Biologists Ltd, 123(1), pp. 1–36. Available at: <https://dev.biologists.org/content/123/1/1>.

Hamilton, M. A., Russo, R. C. and Thurston, R. V. (1977) 'Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays', *Environmental Science and Technology*. doi: 10.1021/es60130a004.

He, H. *et al.* (2018) 'Elucidation of possible molecular mechanisms underlying the estrogen-induced disruption of cartilage development in zebrafish larvae', *Toxicology Letters*. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.02.023.

Hermesen, S. A. B. *et al.* (2011) 'Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies', *Toxicology in Vitro*. doi: 10.1016/j.tiv.2011.01.005.

Hill, A. J. *et al.* (2004) 'Water permeability and TCDD-induced edema in Zebrafish early-life stages', *Toxicological Sciences*. doi: 10.1093/toxsci/kfh056.

Hirai, H. *et al.* (2011) 'Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches', *Marine Pollution Bulletin*. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.06.004.

Howe, K. *et al.* (2013) 'The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome', *Nature*. The Author(s), 496, p. 498. Available at:

<https://doi.org/10.1038/nature12111>.

Hu, Y. *et al.* (2019) 'Occurrence, fate and risk assessment of BPA and its substituents in wastewater treatment plant: A review', *Environmental Research*. doi: 10.1016/j.envres.2019.108732.

Huang, Q. *et al.* (2012) 'Embryonic exposure to low concentration of bisphenol A affects the development of *Oryzias melastigma* larvae', *Environmental Science and Pollution Research*. doi: 10.1007/s11356-012-1034-6.

Huang, R. *et al.* (2018) 'Bisphenol A concentrations in human urine, human intakes across six continents, and annual trends of average intakes in adult and child populations worldwide: A thorough literature review', *Science of The Total Environment*, 626, pp. 971–981. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.144>.

Isan, A. (2017) 'Distribución del agua en el mundo', *Agua.org.mx*.

Ivar Do Sul, J. A. and Costa, M. F. (2014) 'The present and future of microplastic pollution in the marine environment', *Environmental Pollution*. doi: 10.1016/j.envpol.2013.10.036.

Jiang, Z. Y., Hunt, J. V. and Wolff, S. P. (1992) 'Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein', *Analytical Biochemistry*. doi: 10.1016/0003-2697(92)90122-N.

Karimaian, A. *et al.* (2017) 'The crosstalk between Wnt/ β -catenin signaling pathway with DNA damage response and oxidative stress: Implications in cancer therapy', *DNA Repair*. doi: 10.1016/j.dnarep.2017.01.003.

Kim, J. H. and Hong, Y. C. (2017) 'Increase of urinary malondialdehyde level by bisphenol A exposure: a longitudinal panel study', *Environmental Health: A Global Access Science Source*. doi: 10.1186/s12940-017-0221-9.

Kim, S. S. *et al.* (2020) 'Neurochemical and behavioral analysis by acute exposure to bisphenol A in zebrafish larvae model', *Chemosphere*, 239, p. 124751. doi:

10.1016/j.chemosphere.2019.124751.

Kimmel, C. B. *et al.* (1995) 'Stages of embryonic development of the zebrafish', *Developmental Dynamics*, 203(3), pp. 253–310. doi: 10.1002/aja.1002030302.

Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M. and Hocevar, B. A. (2010) 'Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis', *Toxicologic Pathology*. doi: 10.1177/0192623309356453.

Knippschild, U. *et al.* (2005) 'The casein kinase 1 family: Participation in multiple cellular processes in eukaryotes', *Cellular Signalling*. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.12.011.

Köktürk, M., Alak, G. and Atamanalp, M. (2020) 'The effects of n-butanol on oxidative stress and apoptosis in zebra fish (*Danio rerio*) larvae', *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*. doi: 10.1016/j.cbpc.2019.108636.

Laing, L. V *et al.* (2016) 'Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*).', *Epigenetics*, 11(7), pp. 526–538. doi: 10.1080/15592294.2016.1182272.

Lawrence, C. (2007) 'The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review', *Aquaculture*, 269(1), pp. 1–20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>.

LeCorgne, H. *et al.* (2018) 'Differential toxicity of mDia formin-directed functional agonists and antagonists in developing zebrafish', *Frontiers in Pharmacology*. doi: 10.3389/fphar.2018.00340.

Levine, R. L. *et al.* (1994) 'Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins', *Methods in Enzymology*. doi: 10.1016/S0076-6879(94)33040-9.

Li, P. *et al.* (2021) 'Characteristics of Plastic Pollution in the Environment: A Review', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. doi: 10.1007/s00128-020-02820-1.

Liu, Y. *et al.* (2017) 'Occurrence, distribution and sources of bisphenol analogues in a shallow Chinese freshwater lake (Taihu Lake): Implications for ecological and human

health risk', *Science of The Total Environment*, 599–600, pp. 1090–1098. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.069>.

Madera-Parra, C. A. *et al.* (2018) 'ESTUDIO EXPLORATORIO DE LA PRESENCIA DE MICROCONTAMINANTES EN EL CICLO URBANO DEL AGUA EN COLOMBIA: CASO DE ESTUDIO SANTIAGO DE CALI', *Revista internacional de contaminación ambiental*. scielomx, 34, pp. 475–487. Available at:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992018000300475&nrm=iso.

Maldonado, A. T. (2012) 'La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos : una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá', 2012.

Mathisen, G. H. *et al.* (2013) 'Prenatal exposure to bisphenol A interferes with the development of cerebellar granule neurons in mice and chicken', *International Journal of Developmental Neuroscience*. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.09.009.

Mato, Y. *et al.* (2001) 'Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment', *Environmental Science and Technology*. doi: 10.1021/es0010498.

Matthews, J. B., Twomey, K. and Zacharewski, T. R. (2001) 'In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β ', *Chemical Research in Toxicology*. doi: 10.1021/tx0001833.

Mileva, G. *et al.* (2014) 'Bisphenol-A: Epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior', *International Journal of Environmental Research and Public Health*. doi: 10.3390/ijerph110707537.

Misra, H. P. and Fridovich, I. (1972) 'The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase.', *Journal of Biological Chemistry*.

Moreman, J. *et al.* (2017) 'Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish

Embryo-Larvae', *Environmental Science and Technology*. doi: 10.1021/acs.est.7b03283.

Mork, L. and Crump, G. (2015) 'Chapter Ten - Zebrafish Craniofacial Development: A Window into Early Patterning', in Chai, Y. (ed.) *Craniofacial Development*. Academic Press (Current Topics in Developmental Biology), pp. 235–269. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.001>.

Mu, X. *et al.* (2018) 'Developmental Effects and Estrogenicity of Bisphenol A Alternatives in a Zebrafish Embryo Model', *Environmental Science and Technology*. doi: 10.1021/acs.est.7b06255.

Mu, X. *et al.* (2020) 'The pigmentation interference of bisphenol F and bisphenol A', *Environmental Pollution*. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115139.

OECD (2013) 'Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.', *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing*.

Olsvik, P. A. *et al.* (2019) 'Associations between behavioral effects of bisphenol A and DNA methylation in zebrafish embryos', *Frontiers in Genetics*. doi: 10.3389/fgene.2019.00184.

Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N. P. E. (2003) 'Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review', *Environmental Toxicology and Pharmacology*. doi: 10.1016/S1382-6689(02)00126-6.

Parvez, S. and Raisuddin, S. (2005) 'Protein carbonyls: Novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch)', *Environmental Toxicology and Pharmacology*. doi: 10.1016/j.etap.2004.11.002.

Qiu, W. *et al.* (2020) 'The comparative toxicities of BPA, BPB, BPS, BPF, and BPAF on the reproductive neuroendocrine system of zebrafish embryos and its mechanisms', *Journal of Hazardous Materials*, p. 124303. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124303>.

Radi, R. *et al.* (1991) 'Detection of catalase in rat heart mitochondria', *Journal of Biological Chemistry*.

- Rillig, M. C. (2012) 'Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil?', *Environmental Science and Technology*. doi: 10.1021/es302011r.
- Rocha, P. S. *et al.* (2011) 'Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil)', *Ecotoxicology and Environmental Safety*. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.07.009.
- vom Saal, F. S. and Hughes, C. (2005) 'An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment', *Environmental Health Perspectives*. doi: 10.1289/ehp.7713.
- Sahoo, P. K. *et al.* (2020) 'Quercetin abrogates bisphenol A induced altered neurobehavioral response and oxidative stress in zebrafish by modulating brain antioxidant defence system', *Environmental Toxicology and Pharmacology*. doi: 10.1016/j.etap.2020.103483.
- Sakanaka, C., Sun, T. Q. and Williams, L. T. (2000) 'New steps in the Wnt/beta-catenin signal transduction pathway', *Recent progress in hormone research*, 55, p. 225—236. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/11036939>.
- Sarria-Villa, R. *et al.* (2016) 'Presence of PAHs in water and sediments of the Colombian Cauca River during heavy rain episodes, and implications for risk assessment', *Science of the Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.07.020.
- Sarria-Villa, R. and Gallo-Corredor, J. (2016) 'La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos', *Journal de Ciencia e Ingeniería*.
- Sarria, R. and Gallo, J. (2016) 'La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos', *Journal de Ciencia e Ingeniería*.
- Schwarz-Romond, T. *et al.* (2002) 'The ankyrin repeat protein diversin recruits casein kinase I ϵ to the β -catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.230402.

- Seachrist, D. D. *et al.* (2016) 'A review of the carcinogenic potential of bisphenol A', *Reproductive Toxicology*. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.09.006.
- Šutiaková, I., Kovalkovičová, N. and Šutiak, V. (2014) 'Micronucleus assay in bovine lymphocytes after exposure to bisphenol A in vitro', *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*. doi: 10.1007/s11626-013-9727-9.
- Thayer, K. A. *et al.* (2015) 'Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration', *Environment International*. doi: 10.1016/j.envint.2015.06.008.
- Tibor, G. (1998) 'Glutation-peroxidázok', *Magyar Allatorvosok Lapja*.
- Tse, W. K. F. (2017) 'Importance of deubiquitinases in zebrafish craniofacial development', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 487(4), pp. 813–819. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.132>.
- 'UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY' (2012) *Proceedings of the Water Environment Federation*. doi: 10.2175/193864705783867675.
- Valavanidis, A. *et al.* (2006) 'Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants', *Ecotoxicology and Environmental Safety*. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.
- Vandenberg, L. N. *et al.* (2009) 'Bisphenol-a and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption', *Endocrine Reviews*. doi: 10.1210/er.2008-0021.
- Vandenberg, L. N. *et al.* (2012) 'Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses', *Endocrine Reviews*. doi: 10.1210/er.2011-1050.
- Vauti, F. *et al.* (2020) 'All-age whole mount in situ hybridization to reveal larval and juvenile expression patterns in zebrafish', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0237167.
- Völkel, W. *et al.* (2002) 'Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration', *Chemical Research in Toxicology*. doi: 10.1021/tx025548t.

- Wang, K., Zhao, Z. and Ji, W. (2019) 'Bisphenol A induces apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in colon and liver of mice in a mitochondria-dependent manner', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109182.
- Wang, X. *et al.* (2013) 'Bisphenol A affects axonal growth, musculature and motor behavior in developing zebrafish', *Aquatic Toxicology*. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.07.011.
- Weigt, S. *et al.* (2011) 'Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens', *Toxicology*. doi: 10.1016/j.tox.2011.01.004.
- Wells, E. M. (2019) 'Bisphenol A', in *Encyclopedia of Environmental Health*. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.10643-8.
- Westerfield, M. (2007) 'The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition', *University of Oregon Press, Eugene (Book)*.
- Wolkowicz, I. R. H., Herkovits, J. and Pérez Coll, C. S. (2014) 'Stage-dependent toxicity of bisphenol a on *Rhinella arenarum* (anura, bufonidae) embryos and larvae', *Environmental Toxicology*. doi: 10.1002/tox.20781.
- Wu, M. *et al.* (2011) 'Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture', *Environmental Toxicology and Chemistry*. doi: 10.1002/etc.634.
- Yamazaki, E. *et al.* (2015) 'Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India', *Ecotoxicology and Environmental Safety*. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.029.
- Yan, Y. L. *et al.* (2002) 'Erratum: A zebrafish *sox9* gene required for cartilage morphogenesis (Development vol. 129 (5065-5079))', *Development*.
- Zaremba, T. and Oliński, R. (2010) '[Oxidative DNA damage--analysis and clinical significance].', *Postepy biochemii*.

Zeng, X. *et al.* (2005) 'A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation', *Nature*. doi: 10.1038/nature04185.

Zhang, C. *et al.* (2020) 'Fluoxastrobin-induced effects on acute toxicity, development toxicity, oxidative stress, and DNA damage in *Danio rerio* embryos', *Science of the Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137069.

Zhang, X. and Liu, R. (2018) 'Advances in BPA-induced Oxidative Stress and Related Effects and Mechanisms in Liver, 1991-2017', *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. doi: 10.2174/1389557518666180912105345.

Zhu, H. *et al.* (2019) 'Phthalate Metabolites, Hydroxy-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Bisphenol Analogues in Bovine Urine Collected from China, India, and the United States', *Environmental Science and Technology*, 53(19), pp. 11524–11531. doi: 10.1021/acs.est.9b04178.

Zuccato, E. *et al.* (2006) 'Pharmaceuticals in the Environment in Italy: Causes, Occurrence, Effects and Control', *Environmental Science and Pollution Research*, 13(1), pp. 15–21. doi: 10.1065/espr2006.01.004.