



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR
AMOXICILINA Y SU INFLUENCIA SOBRE LA CALIDAD
ALIMENTARIA DE *Cyprinus carpio*”**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

Q.A. JOSÉ MANUEL OROZCO HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR:

DR. OCTAVIO DUBLAN GARCÍA

DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVAN

DRA. HARIZ ISLAS FLORES



TOLUCA ESTADO DE MÉXICO, 2019

Tabla de contenido

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. ANTECEDENTES.....	12
2.1 Agua.....	12
2.2. Contaminación.....	12
2.2.1 Contaminación del agua.....	12
2.2.2 Contaminantes emergentes.....	13
2.2.3 Características de un contaminante emergente.....	14
2.2.4 Legislación de los contaminantes emergentes.....	14
2.3 Fuentes de contaminación.....	16
2.3.1. Contaminación de agua por productos farmacéuticos (amoxicilina).....	17
2.3.2 Antibióticos.....	17
2.3.3 Clasificación y estructura química.....	18
2.3.4 Betalactámicos.....	19
2.4 Efectos del uso de antibióticos en el ambiente.....	19
2.4.1 Resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial.....	20
2.4.2 Amoxicilina.....	22
2.4.3 Producción.....	23
2.4.4 Farmacodinamia de la amoxicilina.....	24
2.5. Farmacocinética de la amoxicilina.....	24
2.5.1 Amoxicilina en el ambiente.....	25
2.5.2 Degradación de amoxicilina.....	26
2.5.3 Contaminación del agua por amoxicilina.....	29
2.5.4 Ocurrencia de amoxicilina.....	29
2.6 Efecto en especies acuáticas.....	30
2.6.1 Como se introduce la amoxicilina al ambiente.....	31
2.6.2 Bioindicador.....	32
2.6.3 Composición nutrimental de la carpa <i>Cyprinus carpio</i>	34
2.6.4 Hábitat de la carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	35
2.7 Producción de carpa <i>Cyprinus carpio</i>	36
2.7.1 Biomarcadores.....	36
2.7.2 Estrés oxidativo.....	37
2.7.3 Radicales libres.....	38

2.7.4 Especies Reactivas de oxígeno.....	39
2.8 Efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas	39
2.8.1 Lipoperoxidación	39
2.8.2 Etapas de la lipoperoxidación.....	40
2.8.3 Efectos de la Lipoperoxidación.....	41
2.8.4 Daño genético (Genotoxicidad).....	41
2.9 Ciclo celular	42
2.9.1 Citotoxicidad	45
2.9.2 Daño a proteínas.....	45
2.9.3 Antioxidantes	46
2.9.4 Propiedades funcionales de las proteínas del musculo de pescado	47
2.9.5 Solubilidad	48
2.9.6 Propiedades gelificantes.....	49
2.9.7 Capacidad de retención de agua	50
2.9.8 Perfil de textura	51
III. Justificación.....	54
IV. Hipótesis	54
V. Objetivos	54
5.1. Objetivo general	54
5.2. Objetivos específicos.....	55
VI. ESTRAGIA METODOLOGICA.....	55
6.1 Obtención y mantenimiento del organismo.....	56
6.1.1 Preparación del medio sintético para mantenimiento de <i>Cyprinus carpio</i>	56
6.1.2 Caracterización fisicoquímica del medio sintético para mantenimiento de <i>Cyprinus carpio</i>	56
6.1.3 Diseño experimental.....	56
6.1.4 Evaluación de los efectos genotóxicos.....	57
6.2 Ensayo cometa.....	57
6.2.1 Ensayo de micronúcleos.....	58
6.2.2 Actividad de la caspasa-3	58
6.2.3 Preparación del extracto celular	58
6.2.4 Ensayo colorimétrico.....	58
6.3 Determinación de la concentración de proteínas totales	59
6.3.1 Ensayo de TUNEL	59
6.3.2. Determinación de la concentracion de proteínas totales	60

6.3.3-A) Determinación de la concentración de AMX en sangre de <i>Cyprinus carpio</i>	60
6.3.4-B) Correlación entre las concentraciones plasmáticas de AMX en <i>C. carpio</i> y los biomarcadores de geno y citotoxicidad.....	61
6.3.5-C) Análisis estadístico.....	61
6.4 Pruebas fisicoquímicas.....	61
6.4.1 Valor de pH (NMX-F-317-S-1978).....	61
6.4.2 Capacidad de retención de agua.....	62
6.4.3 Solubilidad.....	62
6.4.4 Determinación de grupos sulfhidrilo libres.....	62
6.5. Capacidad de gelificación.....	62
6.5.1 Análisis de perfil de textura (TPA).....	63
VII. RESULTADOS.....	63
7.1 Electroforesis unicelular (<i>Ensayo cometa</i>).....	63
7.1.2. Prueba de micronúcleos.....	64
7.1.3 Actividad de caspasa-3.....	65
7.1.4 Ensayo de TUNEL.....	66
7.2 Determinación de la concentración de AMX en agua y sangre de <i>Cyprinus carpio</i>	67
7.2.1 Correlación de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad con los niveles plasmáticos de AMX en carpa común <i>C. carpio</i>	68
7.2.2 Pruebas fisicoquímicas.....	70
7.2.3 pH.....	70
7.2.4 Capacidad de retención de agua.....	70
7.3 Grupos sulfhidrilo.....	71
7.3.1 Solubilidad.....	72
7.3.2 Análisis de perfil de textura.....	73
VIII. DISCUSIÓN.....	76
IX. CONCLUSIONES.....	81
X. BIBLIOGRAFÍA.....	82
XI. ANEXOS.....	85
Genotoxic and cytotoxic alterations induced by environmentally-relevant concentrations of amoxicillin in blood cells of <i>Cyprinus carpio</i>	88

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Límites máximos residuales establecidos en tejido de pescado para diferentes antimicrobianos en Chile, Unión Europea y Japón	21
2	Datos de ocurrencia	29-30
3	Efecto de la amoxicilina y diferentes cuerpos de agua	30-31
4	Determinación de la concentración de AMX en agua del sistema y plasma de carpa común	34
5	Correlación de las concentraciones de AMX con los biomarcadores de geno y citotoxicidad en sangre de <i>Cyprinus carpio</i>	47
6	Cinética de la concentración de AMX en agua del sistema y plasma de carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	66-67
7	Correlación de la concentración de AMX con los biomarcadores de geno y citotoxicidad en sangre	68-69
8	Análisis de perfil de textura en musculo de <i>cyprinus carpio</i> expuesto a amx	74

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Vías de entrada de los contaminantes	16
2	Estructura química de los betalactámicos	19
3	Producción de AMX en diferentes países	23
4	Degradación de AMX en medio acuoso	26
5	Degradación de AMX en medio básico	27
6	Degradación de AMX en medio ácido	27
7	Degradación de AMX a fenol hidroxipirazina	28
8	Oxidación de AMX a AMX-oxidado	28
9	Posibles vías de entrada de AMX en el ambiente	32
10	Carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	33
11	Principales países productores de <i>Cyprinus Carpio</i>	36
12	Esquema central de la apoptosis	43
13	Vías que causan la apoptosis	44
14	Curva típica de análisis de perfil de textura lograda en la máquina de instron	52
15	Determinación del daño al ADN mediante ensayo cometa	63
16	Frecuencia de micronúcleos en sangre de <i>Cyprinus carpio</i>	64
17	Actividad de Caspasa-3 en sangre de <i>Cyprinus carpio</i>	65
18	Determinación mediante ensayo de TUNEL porcentaje de células apoptóticas en sangre	66
19	Determinación de pH en musculo de <i>Cyprinus carpio</i>	69
20	Determinación de capacidad de retención de agua en musculo	70
21	Contenido de grupo sulfhidrilo en musculo de <i>Cyprinus carpio</i>	71
22	Comportamiento de la solubilidad en musculo de <i>Cyprinus</i>	72

carpio

RESUMEN

Los antibióticos desde su descubrimiento, han sido utilizados para tratar enfermedades en humanos ocasionadas por agente patógenos, pero también han sido ocupados para prevenir y tratar infecciones en animales y plantas por igual, así como también para promover el crecimiento animal en la ganadería. La amoxicilina (AMX) es un fármaco ampliamente empleado en medicina humana y veterinaria, en todo el mundo. Su amplia producción y uso ha generado que este fármaco sea liberado al medio ambiente en concentraciones que van desde ng L^{-1} hasta $\mu\text{g L}^{-1}$. Se ha reportado en investigaciones anteriores que tiene relación con estrés oxidativo donde se ha reportado la oxidación de biomoléculas presentes en la especie *Cyprinus carpio*, considerando también la presencia de ciertos fármacos (antibióticos) causando alteraciones en la calidad alimentaria del musculo en ésta especie.

Estudios previos han demostrado que este antibiótico genera efectos tóxicos entre los que destacan daño al DNA, alteraciones al desarrollo embrionario y estrés oxidativo en organismos acuáticos. Sin embargo, es necesario caracterizar de forma más precisa los riesgos que este fármaco produce en especies de interés económico como *Cyprinus carpio*. El objetivo de este estudio fue demostrar si la AMX a concentraciones ambientalmente relevantes es capaz de inducir alteraciones genotóxicas y citotóxicas en *C. Carpio*. Para evaluar la genotoxicidad se empleó el ensayo cometa y la frecuencia de micronúcleos y para determinar efectos citotóxicos se evaluaron la actividad de la caspasa-3 y el ensayo de TUNEL. Los resultados mostraron que los efectos de los biomarcadores tuvieron su máximo a las 72 h, en el caso del ensayo cometa para $0.039 \mu\text{g L}^{-1}$ con 29% y para $1.67 \mu\text{g L}^{-1}$ con 40%; para la frecuencia de micronúcleos de 205% para la C1 y de 311 para la C2; para la actividad de caspasa-3 de 262% para C1 y de 787% para C2 y la prueba de TUNEL de 86% y 120% para la C1 y C2 respectivamente. Los resultados mostraron que a concentraciones ambientalmente relevantes la AMX fue capaz de generar alteraciones al DNA y efectos citotóxicos en células sanguíneas de la carpa común. Los biomarcadores evaluados demostraron ser confiables y eficaces para evaluar el riesgo de esta sustancia en organismos acuáticos. Al presentar daño a las biomoléculas como ADN, lípidos y proteínas, esto a su vez conlleva a la afectación de órganos y tejidos de los cuales se ven afectadas las propiedades texturales y fisicoquímicas. Al realizar las pruebas fisicoquímicas al musculo de *Cyprinus carpio* con el fin de determinar la calidad alimentaria por medio de las siguientes pruebas se encontró una disminución de: pH, capacidad de retención de agua, solubilidad, grupos sulfhidrilos, capacidad de gelificación. Al realizar una correlación de los resultados obtenidos, la AMX es capaz de generar efectos de geno y citotoxicidad y estos a su vez afectan las propiedades fisicoquímicas y texturales (calidad alimentaria).

ABSTRACT

Antibiotics since its discovery, have been used to treat diseases in humans caused by pathogens, but have also been used to prevent and treat infections in animals and plants alike, as well as to promote animal growth in livestock. Amoxicillin (AMX) is a drug widely used in human and veterinary medicine, throughout the world. Its wide production and use has generated that this drug is released to the environment in concentrations ranging from ng L⁻¹ to µg L⁻¹. It has been reported in previous research that it is related to oxidative stress where the oxidation of biomolecules present in the species *Cyprinus carpio* has been reported, also considering the presence of certain drugs (antibiotics) causing alterations in the food quality of the muscle in this species.

Previous studies have shown that this antibiotic generates toxic effects including DNA damage, alterations to embryonic development and oxidative stress in aquatic organisms. However, it is necessary to characterize more accurately the risks that this drug produces in species of economic interest such as *Cyprinus carpio*. The objective of this study was to demonstrate whether AMX at environmentally relevant concentrations is capable of inducing genotoxic and cytotoxic alterations in *C. carpio*. The comet assay and the frequency of micronuclei were used to evaluate the genotoxicity and the activity of caspase-3 and the TUNEL assay were evaluated to determine cytotoxic effects. The results showed that the effects of the biomarkers had their maximum at 72 h, in the case of the comet assay for 0.039 µg L⁻¹ with 29% and for 1.67 µg L⁻¹ with 40%; for the frequency of micronuclei of 205% for C1 and of 311 for C2; for the caspase-3 activity of 262% for C1 and of 787% for C2 and the TUNEL test of 86% and 120% for C1 and C2 respectively. The results showed that, at environmentally relevant concentrations, AMX was able to generate DNA alterations and cytotoxic effects in blood cells of common carp. The biomarkers evaluated proved to be reliable and effective in assessing the risk of this substance in aquatic organisms. By presenting damage to biomolecules such as DNA, lipids and proteins, this in turn leads to the involvement of organs and tissues from which textural and physicochemical properties are affected. When performing the physicochemical tests on the *Cyprinus carpio* muscle in order to determine the food quality by means of the following tests, a decrease was found in: pH, water retention capacity, solubility, sulfhydryl groups, gelling capacity. By making a correlation of the results obtained, the AMX is able to generate geno and cytotoxic effects and these in turn affect the physicochemical and textural properties (food quality).

I. INTRODUCCIÓN

Entre los productos farmacéuticos de mayor consumo, se encuentran los antibióticos que se usan en grandes cantidades en todo el mundo, tanto en medicina humana como en veterinaria para tratar infecciones microbianas y para mejorar el crecimiento y la eficiencia alimenticia del ganado. En consecuencia, se pueden detectar concentraciones relativamente altas de antibióticos en diversos cuerpos de agua (Manzetti and Ghisi, 2014; Zheng et al., 2012). Estudios previos han reportado que los antibióticos más usados son los del grupo de betalactámicos, que se dividen en penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes (Hooper, 2001). Estos antibióticos, son de origen natural o semisintético y se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico, actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana; tienen acción bactericida lenta, relativamente independientes de la concentración plasmática, presentan escasa toxicidad en humanos y poseen un amplio margen terapéutico (Hooper, 2001). Dentro de este grupo, se encuentra la amoxicilina (AMX) que se prescribe para tratar bronquitis, infecciones de oído, piel, garganta y tracto urinario, así como amigdalitis. En acuicultura, la AMX se incorpora a la alimentación granulada o se aplica directamente en el agua para el tratamiento de estreptococosis, forunculosis y pasteurelosis (Lalumera et al., 2004). El amplio uso médico y veterinario de la AMX contribuye a su eliminación en diferentes cuerpos de agua, a través de descargas municipales, hospitalarias e industriales. Esto puede ser demostrado en los diversos reportes que hay en la literatura acerca de su ocurrencia (Fatta-Kassinos et al., 2011; Watkinson et al., 2007). Por ejemplo, Kasprzyk-Hordern et al., (2007) reportaron en un efluente hospitalario y urbano concentraciones de este fármaco de 0.9 y 1.67 $\mu\text{g L}^{-1}$; y en aguas superficiales concentraciones de 0.039-0.0245 $\mu\text{g L}^{-1}$. Así mismo, diversos reportes han demostrado la ocurrencia de AMX en diversos cuerpos de agua en el mundo: en Hong Kong se han reportado concentraciones de 0.64 a 76 ng L^{-1} en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Van et al., 2016); en Palermo, Italia, Zuccato et al., (2010) reportaron concentraciones de 1.80- 4.60 ng L^{-1} en efluentes de plantas tratadoras de aguas residuales; en la Isla Mallorca, España se detectaron concentraciones de 39-283 ng L^{-1} (Rodríguez-Mozaz et al., 2015). Además, la AMX ha sido relacionada con diversos efectos toxicológicos en organismos acuáticos, entre los estudios reportados podemos mencionar a Oliveira et al., (2013) quienes demostraron que por exposiciones a periodos cortos de tiempo en concentraciones de 10 a 900 mg L^{-1} la AMX indujo la eclosión prematura, así como malformaciones como edema, deformaciones de cola en embriones y alteraciones de la actividad enzimática en embriones y adultos de *Danio rerio*. Liu et al., (2015) reportaron que la AMX generó estrés oxidativo en la cianobacteria fotosintética *Microcystis aeruginosa*, al incrementarse los

niveles de malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y glutatión S transferasa (GST), así como el contenido de glutatión (GSH). En contraste, Matozzo et al., (2016) demostraron que la AMX a concentraciones de 100, 200 y 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ disminuyó la actividad de la SOD y la catalasa (CAT) en *Ruditapes philippinarum* and *Mytilus galloprovincialis*. En 2017, una investigación realizada en nuestro grupo de investigación demostró que la AMX a concentraciones de 10ng L^{-1} , 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 10 mg L^{-1} generó un aumento en los niveles de lipoperoxidación (LPX), contenido de hidroperóxidos (HPC) y contenido de proteínas carboniladas (PCC), así como en las enzimas SOD, CAT y glutatión peroxidasa (GPx) en cerebro, riñón, y branquias de *Cyprinus carpio* (Elizalde-Velázquez et al., 2017). La generación de estrés oxidativo inducido por AMX ya demostrada por algunos autores, puede alterar la integridad de biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN, así como asociarse con trastornos orgánicos que pueden afectar a la fecundidad, la salud y el ciclo de vida de peces como ha sido mostrado por Theodorakis et al., (2000), y también provocando genotoxicidad y citotoxicidad. La genotoxicidad puede ser valorada a través de diversos biomarcadores como la electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa), que ha demostrado ser una prueba útil en el monitoreo ambiental y ecotoxicología genética (Bolognesi and Cirillo, 2014) y el ensayo de micronúcleos (MN), que ha sido señalado como uno de los métodos más empleados para medir los cambios cromosómicos estructurales y numéricos en diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo* (Bolognesi and Hayashi, 2011). La citotoxicidad, puede ser también determinada por diferentes biomarcadores, sin embargo, la actividad de la caspasa-3 y la prueba de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) han demostrado ser muy eficientes en la valoración de la citotoxicidad en organismos acuáticos (Alak et al., 2019; Formigari et al., 2007; Sun et al., 2019; Wang et al., 2019). Por lo anteriormente expuesto, el propósito de este estudio fue evaluar las alteraciones genotóxicas y citotóxicas inducidas por concentraciones ambientalmente relevantes de AMX en células sanguíneas de la carpa común *C. carpio*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Agua

El agua es una sustancia natural fundamental en el planeta, utilizable para procesos ambientales, sociales, industriales e indispensables para la vida humana. La proporción de agua representa el 75% de la superficie total, pero no toda está presente en condiciones óptimas para el uso humano. El 97% es salada, y solo el 2.5% restante es dulce y está distribuida en ríos, lagos, arroyos, etc. (CONAGUA, 2015; Hiriart, 2015; SAGAN, 2007).

El desarrollo de la sociedad conlleva al uso descontrolado del agua que es empleada para distintas actividades tales como: agricultura, minería, industria, uso doméstico, y uso en hospitales. El deterioro en su calidad por el ingreso de contaminantes ha generado impacto en los ecosistemas acuáticos, así como en la disponibilidad para su consumo humano (CONAGUA, 2015; Hiriart, 2015; SAGAN, 2007). Actualmente la calidad de este recurso se ha visto afectada por la presencia de diversos contaminantes.

2.2. Contaminación

Es la presencia de toda sustancia que, en cualquiera de sus estados, físicos y químicos, al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altera o modifica su composición y condición natural, causando un desequilibrio ecológico. La generación o descarga de materia o energía, en cualquier cantidad, estado físico o forma, que, al incorporarse, acumularse o actuar en los seres vivos, al agua, suelo, subsuelo afecta negativamente su composición o condición natural son consideradas emisiones contaminantes (Hiriart, 2015).

2.2.1 Contaminación del agua

Los niveles de contaminación en los cuerpos de agua han ido creciendo de manera peligrosa debido a las actividades urbano-industriales y representa un problema ambiental para las sociedades del mundo (Alloway & Ayres, 1993). Se considera contaminación a la adición de cualquier sustancia al agua en cantidad suficiente para producir daño alguno a la flora y fauna, debido a causas naturales o actividades antropogénicas (SAGAN, 2007). La contaminación del agua se puede producir por: microorganismos patógenos, desechos orgánicos, sustancias químicas inorgánicas, nutrientes vegetales inorgánicos, compuestos orgánicos, sedimentos y materiales suspendidos, sustancias radiactivas.

2.2.2 Contaminantes emergentes

El término de contaminantes emergentes se utiliza para referirse a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos y no se encuentran legislados ambientalmente; no obstante, ahora están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de producir impacto ecológico, así como generar efectos adversos sobre la salud de los hidrobiontes (Barcelo & Lopez, 2007).

La lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos de uso diario con aplicaciones tanto industriales como domésticas. Algunos de ellos, a raíz de las intensas investigaciones llevadas a cabo en los últimos años, han sido incluidos en la lista de sustancias prioritarias en el agua (Petrovic *et al.*, 2003).

De acuerdo con citas bibliográficas publicadas en los últimos años, entre las clases de contaminantes emergentes que demandan una mayor atención (debido a la escasez de datos ambientales, ecotoxicológicos, métodos para su análisis y las posibles consecuencias de su presencia en el medio ambiente) se encuentran:

1. Los retardantes de llama bromados
2. Los cloroalcanos
3. Los fármacos
4. Las drogas de abuso, y
5. Los metabolitos y/o productos de degradación

Los contaminantes emergentes comprenden una amplia gama de compuestos químicos, fármacos, productos de cuidado personal, agentes tensoactivos, plastificantes y aditivos industriales, que no están incluidos en el monitoreo actual de programas de tratamiento de aguas; también incluye la síntesis de nuevos compuestos químicos o cambios en el uso y disposición de los 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 éstas son más susceptibles de contener concentraciones mayores de contaminantes emergentes que las aguas subterráneas (Gil *et al.*, 2012).

2.2.3 Características de un contaminante emergente

Los contaminantes emergentes tienen las siguientes características:

- a) Datos disponibles de riesgo y concentraciones en el ambiente escasos
- b) No están incluidos en los programas de monitoreo nacionales
- c) Existen indicadores o pruebas de que son persistentes o pseudo-persistentes y bioacumulables
- d) Son candidatos potenciales para realizar mediciones internacionales
- e) Se usan en grandes cantidades y así mismo se eliminan en grandes cantidades en el ambiente (Joint Nordic, 2014).

Los fármacos, de entre todos los contaminantes emergentes, son los que probablemente suscitan mayor preocupación y en particular, los antibióticos. El consumo de fármacos en los países de la UE se cifra en toneladas por año, y muchos de los más usados son los antibióticos (Jones *et al.*, 2011).

2.2.4 Legislación de los contaminantes emergentes

Aunque existen diversos estudios acerca de contaminantes emergentes en la literatura internacional, existe una gran brecha entre estos datos y el marco regulatorio de estas sustancias. Esto probablemente se deba a la falta de información que cuantifique los riesgos que conlleva una exposición prolongada de estos contaminantes o sus metabolitos en la flora o la fauna (Santos *et al.*, 2010). En Estados Unidos, la Agencia de Protección al Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) periódicamente publica una lista de contaminantes no regulados “Lista de contaminantes candidatos” (CCL, por sus siglas en inglés) que se sabe o se anticipa que puedan llegar a encontrarse en los sistemas de agua, y los cuales pueden requerir una regulación en el futuro para poder no encontrarlos en el agua bebible (USEPA, 2011).

En Europa, no existen restricciones con respecto a la presencia de contaminantes emergentes en el ambiente, pero se han estado haciendo esfuerzos para evaluar el riesgo que poseen las sustancias químicas partiendo del conocimiento de sus propiedades intrínsecas (peligrosidad) para los seres humanos (exposición laboral, exposición por consumo directo o exposición a través de la cadena trófica) y para los diferentes compartimentos del ambiente (agua, aire, suelo), a nivel de ecotoxicidad, bioacumulación y propiedades de persistencia en el ambiente, por la promulgación de REACH EC 1907/2006 (Comunidad Europea para la regulación de químicos y su uso seguro). Esta

promulgación tiene que ver con el registro, evaluación, autorización y restricción de todos los químicos. Por lo tanto hace énfasis en la evaluación del riesgo de sustancias antes de ser registradas (Bolong *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010). Con respecto a los compuestos farmacéuticos, en Estados Unidos están regulados por la FDA, la cual requiere una medición de riesgo ambiental (cuando la concentración ambiental encontrada excede un valor de 1µg/L) para obtener una autorización en el mercado; sin embargo aún no se encuentra normativa ambiental alguna ni estándares de vertimiento (Bolong *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2012).

A mediados la década pasada con el fin de armonizar la normatividad con respecto a los fármacos de uso humano y veterinario, así como también para usar los mismos datos de destino ambiental y de toxicidad en todo el mundo, Estados Unidos y Japón elaboraron dos normatividades: “Environmental Impact assessment for Veterinary Medical Products- Phase I and Phase II” y “Environmental Risk assessment of medical products for human use” (EMEA, 2006).

En la actualidad México no cuenta con legislación que estipule la presencia de productos farmacéuticos como la amoxicilina en el medio ambiente, y con menos razón límites permisibles para éstos. En años recientes el gobierno Mexicano ha hecho esfuerzos importantes para mejorar su política ambiental, como su inclusión a finales de la década de los noventas a la “Red Internacional para la Estandarización e Inter-calibración de una Batería de Métodos para probar la Toxicidad Acuática” (WaterTox Network) y la publicación en 2007 por parte del Instituto Nacional de Ecología de metodologías detalladas de bioensayos en organismos acuáticos y terrestres, incluyendo muchas especies nativas, para la medición del riesgo ambiental; sin embargo los avances en el campo de ecotoxicología son lentos comparándolos con los países desarrollados debido a los limitados recursos económicos y a los escasos recursos humanos y de infraestructura destinados para este fin (Mendoza Cantú *et al.*, 2007).

En México la disminución en la calidad del agua ha sido relacionada con la falta de políticas económicas conscientes que promuevan la conservación de los recursos naturales y a la falta de tecnología y programas tecnológicos encaminados a preservar, tratar y reutilizar el agua (Mendoza Cantú *et al.*, 2007). Considerando que la gran mayoría de contaminantes provienen de los desechos industriales y vertido de plantas tratadoras de agua, es importante mencionar que hasta ahora, no existen programas en México que evalúen la toxicidad de los efluentes de plantas tratadoras de agua, simplemente se evalúa la calidad de los efluentes a través de parámetros fisicoquímicos. Por ley, las regulaciones ambientales deben ser revisadas cada cinco años y actualmente se está analizando el uso de una batería de bioensayos, como una mejor opción y más barata para proteger los ambientes acuáticos y sus organismos (Mendoza Cantú *et al.*, 2007).

2.3 Fuentes de contaminación

Los efluentes han sido identificados como la principal vía de entrada de los productos farmacéuticos en el ambiente acuático (Luja-Mondragon *et al.*, 2019). Un efluente está definido como el vertido de líquidos de desecho, generados por diversas actividades humanas, hacia sistemas colectores o directamente a corrientes de agua (Jacquenod de Zsögön, 2007). La presencia en el ambiente de un producto farmacéutico está en función de muchas variables, incluyendo la cantidad fabricada, dosis y frecuencia, la persistencia en el ambiente, el metabolismo del compuesto y la eficacia de las plantas de tratamiento de aguas residuales en su remoción. En México, los antibióticos son uno de los grupos más vendidos y más utilizados (Gómez-Oliván *et al.*, 2018), estos se encuentran de varias formas farmacéuticas y se usan de forma irracional ya que se venden sin receta médica.

Los productos farmacéuticos están diseñados para persistir y pueden tener una vida media larga en el ambiente, pueden acumularse, alcanzando niveles detectables y biológicamente activos. La persistencia en el ambiente se rige por la biodegradación, fotólisis por la luz solar y otras transformaciones abióticas, como la hidrólisis (Yamamoto *et al.*, 2009).

En el ambiente, estos compuestos pueden ser transportados y distribuidos por diferentes vías. La industria farmacéutica genera gran cantidad de aguas residuales de características y concentraciones variables, que están en función de los procesos de fabricación utilizados y la estación del año. Las principales fuentes de contaminación se describen en la figura 1.

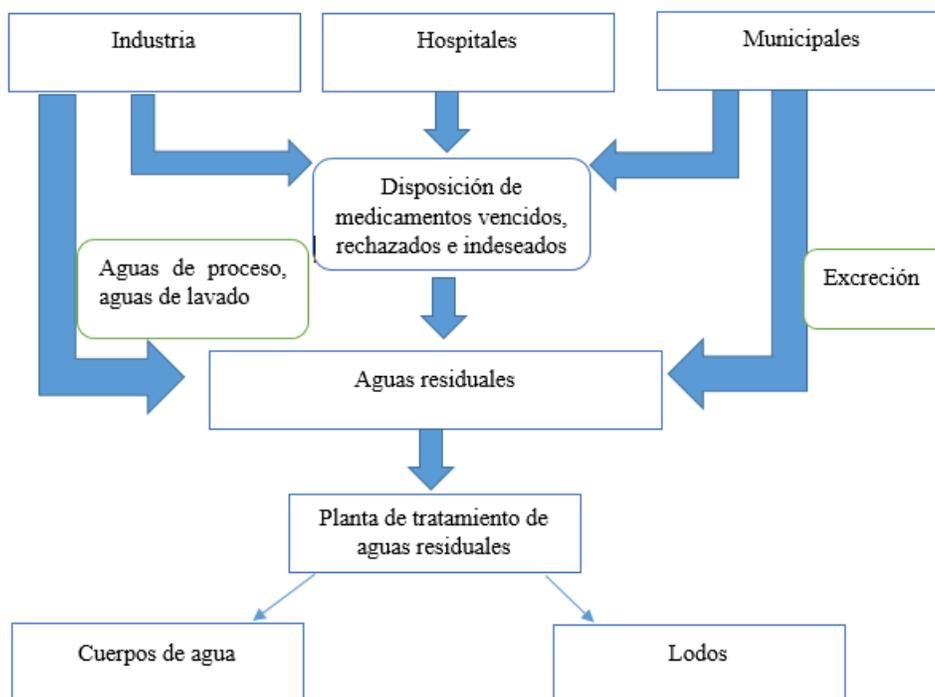


Figura 1: vías de entrada de los contaminantes.

2.3.1. Contaminación de agua por productos farmacéuticos (amoxicilina)

Los fármacos son componentes biológicamente activos, empleados para restablecer la salud tanto de los seres humanos como de los animales. Estas sustancias pueden tener respuestas inesperadas en organismos menores debido a diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas (Fent *et al.*, 2006).

En las últimas décadas se ha prestado creciente atención a la presencia de productos farmacéuticos en los ecosistemas acuáticos, ya que estas sustancias son capaces de inducir efectos negativos a las especies no acuáticas (Daughton y Ternes 1999 , Kolpin *et al.*, 2002 , Metcalfe *et al.*, 2003 , Bringolf *et al.*, 2010 , Matozzo 2014 , Fabbri, 2015). Entre los productos farmacéuticos, los antibióticos se utilizan en grandes cantidades en todo el mundo en medicina humana y veterinaria para tratar las infecciones microbianas y para mejorar el crecimiento y la eficiencia alimenticia del ganado. En consecuencia, se pueden detectar concentraciones relativamente altas de antibióticos en diversos ecosistemas acuáticos (Sarmah *et al.*, 2006 ; Kümmerer 2009 ; Zheng *et al.*, 2012 ; Manzetti y Ghisi 2014).

De los numerosos antibióticos, la amoxicilina (AMX) es una de las más utilizadas en todo el mundo en medicina humana y veterinaria. Por ejemplo, AMX se prescribe para tratar bronquitis, infecciones de oído, infecciones de la piel, infecciones de garganta, amigdalitis e infecciones del tracto urinario en seres humanos. A este respecto, la tasa de excreción de AMX como compuesto inalterado puede ser del 80% al 90% (Hirsch *et al.*, 1999). En la acuicultura, AMX se incorpora a la alimentación en pellets o se aplica directamente en el agua para el tratamiento de la estreptococosis, la furunculosis y la pasteurelosis (Lalumera *et al.*, 2004). En consecuencia, AMX puede llegar al medio acuático a través de la alimentación no consumida o a través de las heces de los organismos tratados (Halling-Sorensen *et al.*, 1998 ; Lalumera *et al.*, 2004). En los ecosistemas acuáticos, AMX puede encontrarse en la gama ng / L-µg / L (Andreozzi *et al.*, 2004 , Park 2005 , Aydin y Talinli, 2013).

2.3.2 Antibióticos

El descubrimiento de la penicilina se atribuye a Alexander Fleming quien, en septiembre de 1928, observó que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en algunos de los tubos de ensayo utilizados para el cultivo se inhibía ante la presencia del hongo *Penicillium notatum*. Este hongo producía una sustancia capaz de impedir el crecimiento no sólo de diferentes tipos de estafilococos, sino también de muchos estreptococos. En 1930, Cecil George Paine, un joven microbiólogo, utilizó por primera

vez la penicilina como tratamiento tópico en varios sujetos con infecciones cutáneas (sicosis) y ocular (endoftalmía neonatal). Sin embargo, debido a problemas de estabilidad química, el primer tratamiento parenteral con penicilina, tuvo que esperar hasta 1940 (Campos *et al.*, 2007).

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, tienen propiedades meta estables, y producen durante su biotransformación metabolitos activos tanto en su forma hidrolizada como conjugada (García-Galán *et al.*, 2008), lo que conlleva a que una gran cantidad de compuestos químicos activos sean continuamente liberados en el ambiente con posibles propiedades reactivas y un sin número de consecuencias aún desconocidas.

Los antibióticos se pueden dividir en: betalactámicos, glicopéptidos, aminoglucósidos, macrólidos, y quinolonas.

2.3.3 Clasificación y estructura química

La presencia del anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos. Además, éste determina el mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad directa (actúa sobre la pared celular del microorganismo que no está presente en la célula eucariota animal) y el principal mecanismo de resistencia (las betalactamasas) de esta gran familia de antibióticos. No obstante, para que el betalactámico sea activo, es preciso que esté unido a otros radicales (habitualmente otros anillos). La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias de este esqueleto básico formado por los 2 anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas. Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar las características del antibiótico, como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las betalactamasas. En la figura 2 se representa de forma esquemática la estructura básica de los diferentes grupos de betalactámicos (García Sánchez *et al.*, 1999).

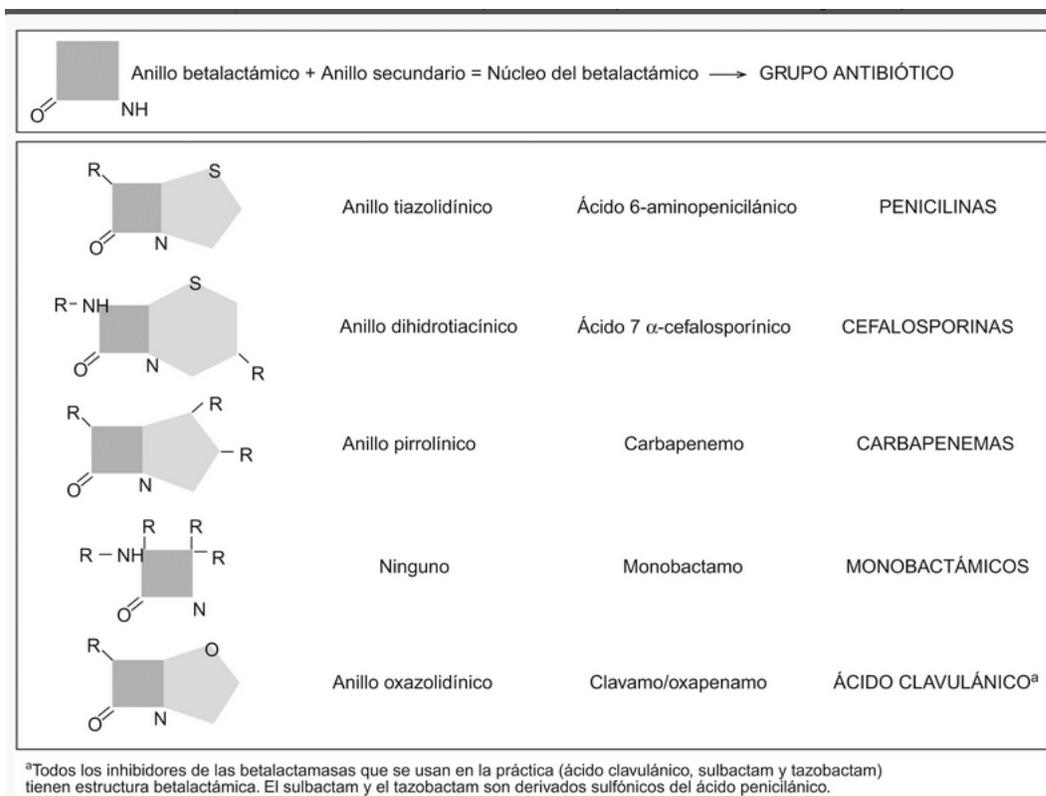


Figura 2. Estructura química de los betalactámicos

2.3.4 Betalactámicos

Los betalactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético, que se caracteriza por poseer en su estructura un anillo betalactámico. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se caracterizan por su acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, regularmente presentan escasa toxicidad y poseen un escaso margen terapéutico (Hooper, 2001).

Los antibióticos beta lactámicos se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes (Hooper, 2001).

2.4 Efectos del uso de antibióticos en el ambiente

La principal vía de aplicación de antibióticos es a través del alimento, y la absorción del fármaco por parte del pez varía en gran medida según el tipo de antibiótico utilizado. Antibióticos como los fenicoles tienen un porcentaje de absorción mayor al 90%, siendo una cantidad muy baja la que es excretada a través de las heces. Otros, sin embargo, tienen porcentajes de absorción muy bajos en el

intestino del pez, aumentando su presencia en el medio acuático, como es el caso de la oxitetraciclina. Estos valores van a depender de la biodisponibilidad de los antibióticos en el pez, la que puede verse influenciada por el medio donde se encuentre.

Los antibióticos excretados por el pez y en el alimento medicado no consumido, son incorporados al agua y/o al fondo del estanque de cultivo. En los procesos de limpieza, parte de estos antibióticos podrían quedar en los lodos, con una actividad antimicrobiana que es necesario evaluar. En el supuesto caso de existir antibióticos en los lodos de piscicultura y de definirse su uso en agricultura, es necesario estudiar su potencial efecto sobre el suelo. Fenómenos ambientales como lluvias y variaciones de temperatura, al igual que el tipo de suelo, pueden hacer variar enormemente el tiempo de permanencia de eventuales antibióticos en el lodo, pudiendo ser de días, semanas, e incluso meses.

2.4.1 Resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial

Como ha sido demostrado en otros países, el uso excesivo de antibióticos en acuicultura tiene implicaciones negativas para la salud humana y animal (Bjorlundm, 1990; Grave *et al.*, 1999; Wolf, 2004; Cabello, 2004) y para el medio ambiente (Samuelsen *et al.*, 1992; Hektoen *et al.*, 1995; Buschmann *et al.*, 2006; Cabello, 2006).

Su uso indiscriminado presenta serios problemas, porque los patógenos se hacen cada vez más resistentes a los tratamientos antibióticos habituales (Le Goff, 2003); y las bacterias farmacorresistentes son transmitidas a través de la cadena alimentaria al consumidor provocando una enfermedad, lo que hoy en día, es una complicación mayor para los servicios de salud pública en todo el mundo (Le Goff, 2003), por lo que su buen uso favorecería su eficacia clínica y disminuiría la resistencia de las bacterias a estos fármacos, como así también, ayudaría a disminuir su impacto ambiental.

Una herramienta clave necesaria para enfrentar ésta problemática, es el antibiograma, que es un estudio de la sensibilidad “*in vitro*” de un microorganismo patógeno frente a moléculas antibióticas (Bauer *et al.*, 1996). A través de este estudio es posible caracterizar la magnitud de la resistencia a través de las pruebas de dilución y concentraciones inhibitorias mínimas (CIM). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM), están definida como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que evita el crecimiento visible de microorganismos (Miller *et al.*, 2005). La

determinación de las CIM para los patógenos específicos, provee datos, que conjuntamente con los parámetros farmacocinéticos de los agentes antimicrobianos en el animal, posibilita predecir la eficacia “*in vivo*” del compuesto en el tratamiento de alguna enfermedad específica. Los resultados de las CIM se reportan con criterios de interpretación definidos como: sensible, intermedio y resistente, los que están debidamente estandarizados por “National committee for clinical laboratory standards” U.S.A.(<http://www.clsi.org/>).

Esta prueba permite finalmente usar los antibióticos de una manera medida, responsable y a dosis correctas, contribuyendo así a disminuir la selección de bacterias resistentes en el ambiente acuático (Lees y Aliabadi, 2002; Miller, 2007). Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), comprendiendo la gravedad del problema de la resistencia a los antimicrobianos en el mundo, han enfatizado en la importancia de supervisar el uso correcto de los antibióticos en medicina veterinaria (y humana), publicando informes y recomendaciones a este respecto, como fue el caso por ejemplo del establecimiento de Límites Máximos Residuales (LMR) en tejidos de salmónidos, y la publicación de un documento por parte de la OMS el año 2000 titulado “Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos”, publicaciones que contribuirían a minimizar este problema que aqueja cada vez más a la industria acuícola.

En el manual de procedimientos del programa de control de fármacos, elaborado por el Sernapesca, se incluyen aspectos relativos al uso y control de residuos de productos farmacéuticos en la acuicultura, así como el control de residuos de contaminantes y sustancias prohibidas. En el Anexo I del FAR/MP1 se establecen los límites máximos residuales establecidos por Chile, la Unión Europea y Japón para los productos farmacéuticos en carne y piel de pescado.

Tabla N° 1. Límites Máximos Residuales establecidos en tejidos de pescado (carne y piel) para diferentes antimicrobianos en Chile, la Unión Europea y Japón.

Principio activo	Chile	Unión Europea	Japón
Oxitetraciclina	100 µg/Kg	100 µg/Kg	200 µg/Kg
Sulfonamidas	100 µg/Kg	100 µg/Kg	100 µg/Kg
Trimetoprim	-	50 µg/Kg	80 µg/Kg
Florfenicol	1000 µg/Kg	1000 µg/Kg	200 µg/Kg

Eritromicina	200 µg/Kg	200 µg/Kg	200 µg/Kg
Amoxicilina	50 µg/Kg	50 µg/Kg	50 µg/Kg

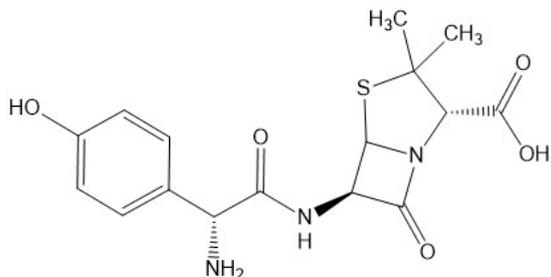
(Fuente: FAR/MP1, 2013)

2.4.2 Amoxicilina

La amoxicilina es un antibiótico semisintético de amplio espectro derivado de la penicilina, perteneciente al grupo de los betalactámicos. Es utilizada ampliamente para el tratamiento de infecciones otorrinolaringológicas, de las vías urinarias, cutáneas e infecciones de las vías respiratorias causadas por cepas susceptibles de *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, así como también para el tratamiento agudo de enfermedades venéreas como la blenorragia. La amoxicilina actúa contra un amplio espectro de microorganismos, gram-positivos y negativos, por esta razón se emplea como antibiótico de primera elección tanto en medicina humana como en la veterinaria (Calvo & Martínez, 2009; Iannacone & Alvarino, 2009; Suarez & Gudiol, 2009; Valdés *et al.*, 1998).

El núcleo activo de las penicilinas es el ácido 6-aminopenicilánico, constituido por una estructura β-lactámico-tiazolidínica anillada, la cual se une a una cadena lateral variable. (Suarez & Gudiol, 2009; Valdés *et al.*, 1998).

Composición, información sobre el activo y propiedades fisicoquímicas.



Nombre químico: Ácido (2S,5R,6R)-6-[(2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil) acetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tio-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico.

Fórmula química: C₁₆H₁₉N₃O₅S

Log Kow: 0.87

Log D (pH 7.4): -2.73

pka: 2.4

Solubilidad en agua (g/L): 3.43

Clasificación farmacológica: Antibiótico betalactámico derivado semisintético de la penicilina

Clasificación terapéutica: Antibiótico de amplio espectro

Estado físico: sólido

Color: blanco-amarillento

Olor: ligero

Valor p H: 3.5-5.5

Solubilidad en

Agua: Muy poco soluble

Etanol: Muy poco soluble

Cloroformo: Prácticamente insoluble

Éter: Prácticamente insoluble

2.4.3 Producción

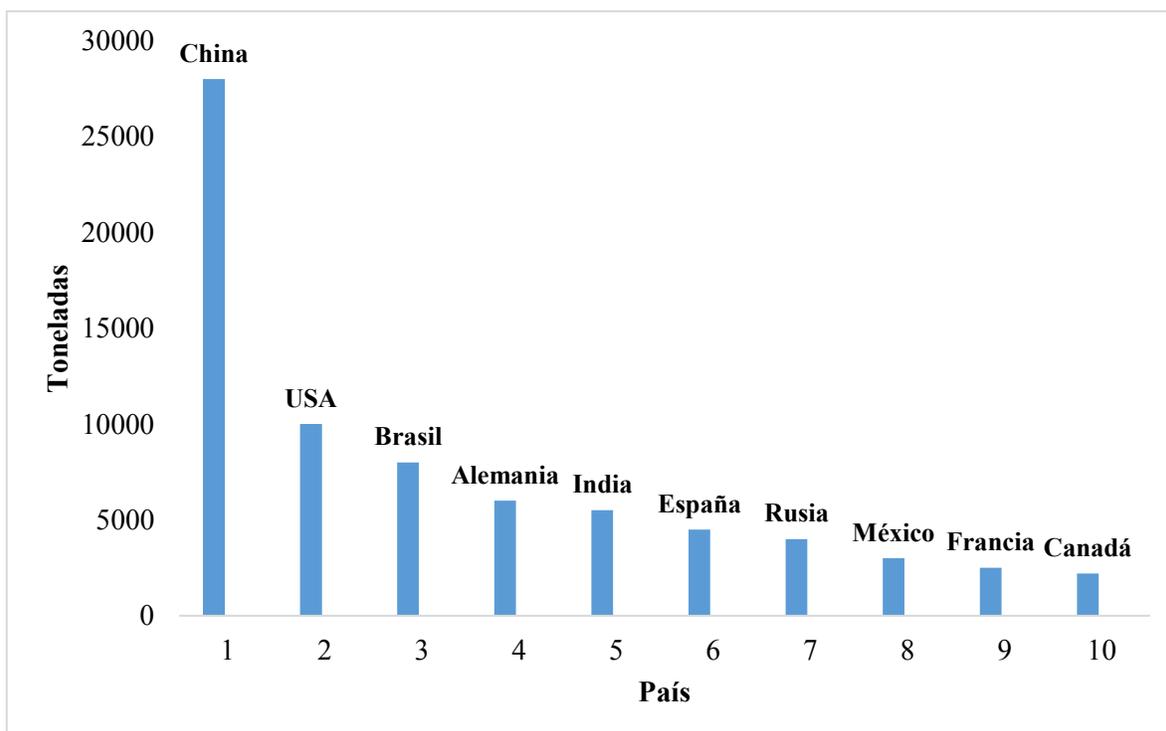


Figura 3. Producción de Amoxicilina en diferentes países.

Fuente: Van Boeckel *et al.*, 2014

Los antibióticos se encuentran entre los medicamentos que más se venden y se consumen en México representan un mercado anual de 960 millones de dólares (Figura 3) y el segundo lugar en ventas anuales (14.3%) en farmacias privadas en el país.

2.4.4 Farmacodinamia de la amoxicilina

La amoxicilina al igual que los demás antibióticos betalactámicos actúa uniéndose a su anillo beta lactámico en el sitio activo de las proteínas fijadoras de penicilina 1A (PFP-1A) o también llamadas transpeptidasas, localizadas en el interior de la pared celular bacteriana, estas enzimas tienen como función primordial unir las capas de precursores de peptidoglicano mediante entrecruzamientos peptídicos, sin embargo, esta enzima es acilada en su sitio activo transpeptidasa C-terminal por la amoxicilina, de esta manera no puede producir su acción, por tanto no puede unir peptidicamente los precursores de peptidoglicano, y como resultado inhibe el tercer y último paso de la síntesis de la pared bacteriana, produciendo finalmente la lisis de las bacterias, mediante enzimas autocatalíticas como las autolisinas (Okamoto *et al.*, 2002; Imming *et al.*, 2006; Overington *et al.*, 2006; Suarez & Gudiol, 2009).

2.5. Farmacocinética de la amoxicilina

Absorción: Después de la administración oral, la amoxicilina se absorbe rápida y completamente en la primera porción duodenal. Se ha demostrado que la amoxicilina es estable en medio ácido y la administración con alimentos no interfiere con su absorción (Suarez & Gudiol, 2009; Saavedra *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2000; Carceles *et al.*, 1998).

Distribución: La concentración plasmática máxima se alcanza dos horas después de su administración, la unión a proteínas plasmáticas es aproximadamente del 20%. Tiene una distribución corporal amplia, con concentraciones séricas y tisulares adecuadas en la mayoría de los tejidos, incluidos la bilis y el líquido sinovial; atraviesa sin problema la barrera placentaria, pero no penetra el sistema nervioso central. Al tratarse de una sustancia poco lipofílica, su penetración intracelular también es escasa (Suarez & Gudiol, 2009; Saavedra *et al.*, 2008; Carceles *et al.*, 1998; Valdés *et al.*, 1998).

Biotransformación: De manera general las penicilinas no se metabolizan en forma extensa a nivel hepático. De 10 a 25% de la amoxicilina absorbida es transformada en ácido amoxicilónico, mediante la hidrólisis del anillo beta lactámico por acción de betalactamasas o por las mismas condiciones fisiológicas. No se conocen enzimas humanas asociadas a su metabolismo (Suarez & Gudiol, 2009; Saavedra *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 2004; Valdés *et al.*, 1998).

Excreción: La mayor parte de la amoxicilina se excreta de manera inalterada por la vía renal (70%), aunque también se elimina por la vía biliar (30%) especialmente cuando se administran dosis altas del antibiótico. La amoxicilina al igual que todas las penicilinas se excreta con la leche materna. El tiempo de vida media oscila alrededor de una hora. La semivida de eliminación de la mayoría de los betalactámicos (con función renal normal) es baja por lo que en general deben administrarse varias veces al día (Suarez & Gudiol, 2009; Carceles *et al.*, 1998; Valdés *et al.*, 1998).

2.5.1 Amoxicilina en el ambiente

Una vez descargados en el agua, la concentración en la fase acuosa de los contaminantes puede disminuir debido a distintos procesos. Dentro de los procesos que pueden sufrir los productos farmacéuticos en el ambiente acuático están (Gurr y Reinhard, 2006):

- a) Dispersión y dilución
- b) Volatilización
- c) Sorción
- d) Fotólisis
- e) Biodegradación y Biotransformación

La fotodegradación causada por la irradiación solar y la degradación biótica son considerados como los principales procesos naturales para la degradación de los contaminantes presentes en los cuerpos de agua (Vincenzo y Rizzo, 2012).

Las amino penicilinas como la amoxicilina son bien conocidas por tener una vida media corta en los ambientes acuáticos. La estructura química única de éste tipo de antibióticos, se degrada con facilidad por hidrólisis en ambientes ácidos y básicos, así como también se degrada rápidamente debido a las enzimas beta-lactamasas presentes en el agua de algunas bacterias (Gozlan *et al.*, 2009).

2.5.2 Degradación de amoxicilina

La degradación de la amoxicilina en medio acuoso empieza con la apertura del anillo beta lactámico, catalizada por la presencia de metales bivalentes como Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} y Fe^{+2} , o la presencia de enzimas betalactamasas, generando como producto final el AMX-Ácido amoxicilóico (Figura 4), el cual posee un grupo extra ácido carboxílico en su estructura.

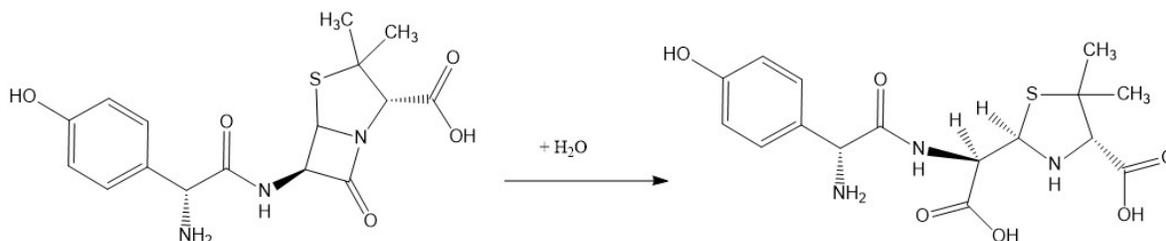


Figura 4. Degradación de la amoxicilina en medio acuoso generando como producto final el AMX-Ácido amoxicilóico (Gozlan *et al.*, 2013)

Subsecuentemente, este intermediario rápidamente sufre modificaciones en su estructura para formar productos más estables; en medio básico los pares de electrones libres del grupo amino primario producen un ataque nucleofílico sobre el grupo carboxílico extra formado en la reacción anterior, lo que genera la formación de un anillo de seis miembros, dando como resultado la formación de un intermediario estable, la AMX-Dicetopiperazina- 2',5' (Figura 5).

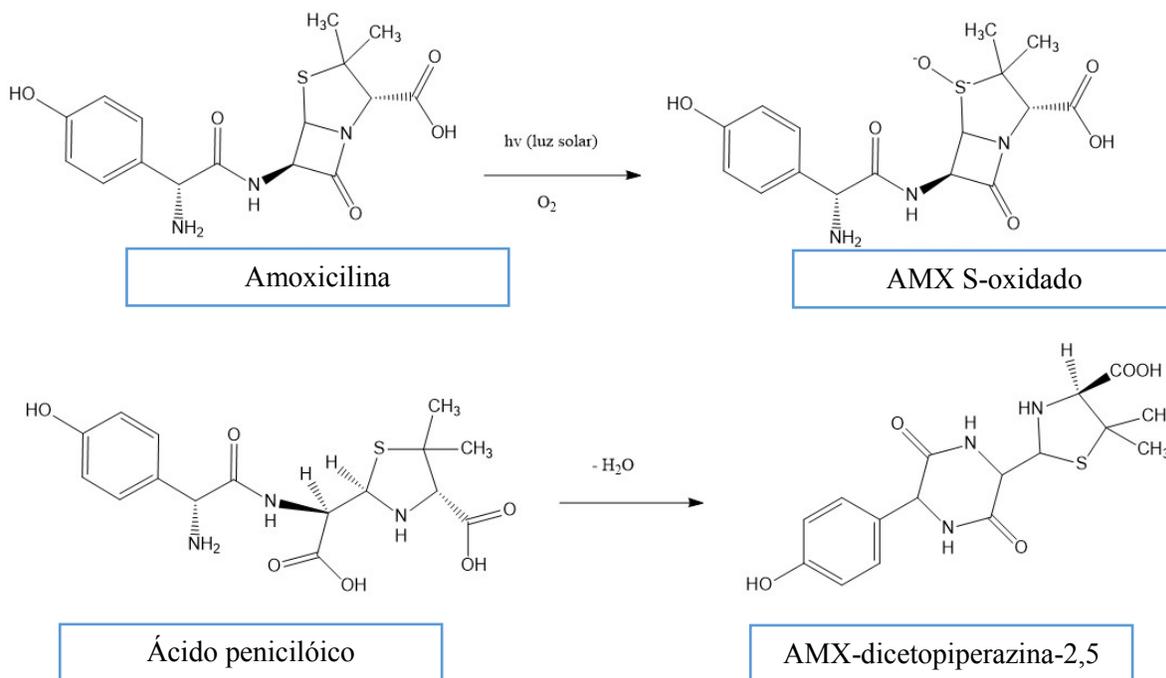


Figura 5. Degradación de AMX-Ácido amoxicilónico en medio básico, generando como producto final la AMX-dicetopiperazina (Gozlan *et al.*, 2013)

Por el contrario, el intermediario AMX-Ácido amoxicilónico en medio ácido sufre una descarboxilación, generando de esta manera otro intermediario estable, el AMX-Ácido penilólico (Figura 3) (Gozlan *et al.*, 2013).

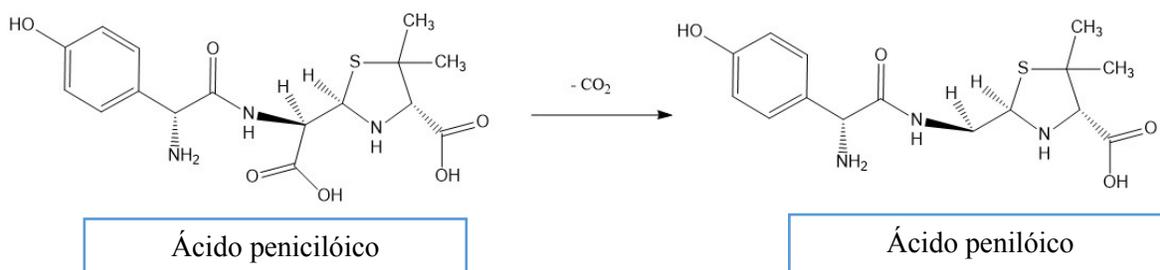


Figura 6. Degradación de AMX-Ácido amoxicilónico en medio ácido, generando como producto final la AMX-ácido penilólico (Gozlan *et al.*, 2013)

Así mismo en la industria farmacéutica es bien conocida la presencia de otro producto de degradación de la amoxicilina, el fenol hidroxipirazina (Figura 4), actualmente el mecanismo de formación de este intermediario es aún desconocido (Gozlan *et al.*, 2013).

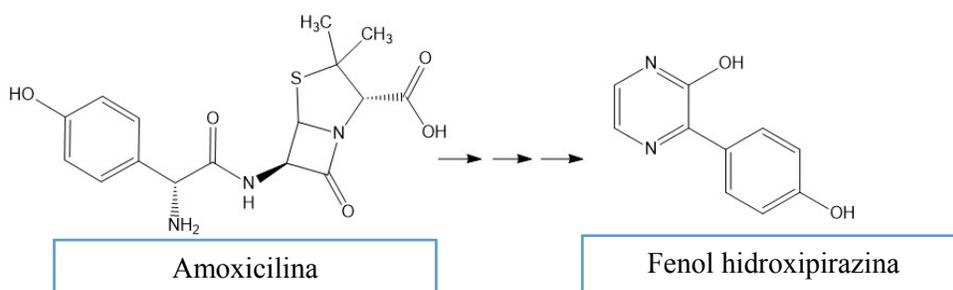


Figura 7. Degradación de Amoxicilina a fenol hidroxipirazina (Gozlan *et al.*, 2013)

Por otro lado el principal producto de degradación de la amoxicilina debido a transformaciones abióticas en ambientes naturales es el que se obtiene como resultado de fotólisis indirecta, bajo estas condiciones el oxígeno molecular atmosférico disuelto en el agua es activado por sustancias foto sintetizadoras naturales como los ácido húmicos, consecuentemente la molécula de amoxicilina es oxidada por un ataque del oxígeno activado a la molécula de azufre presente en el anillo de tiazolidina de la amoxicilina, generando el producto final de degradación oxidado AMX-S-oxidado (Figura 5) (Gozlan *et al.*, 2010).

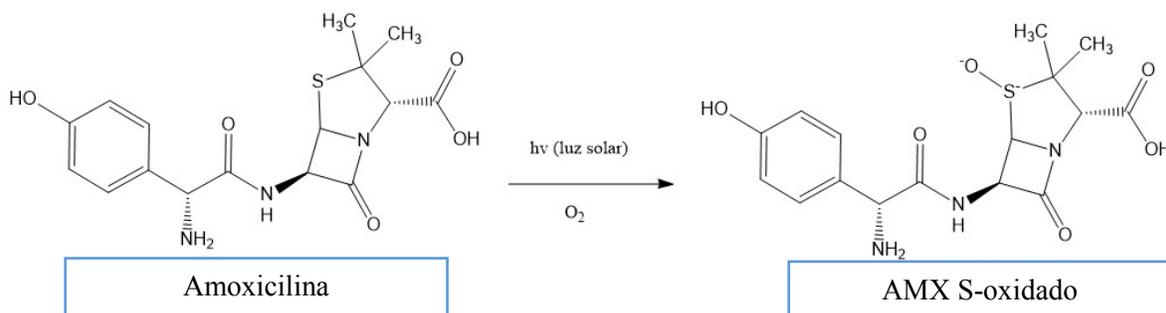


Figura 8. Oxidación de Amoxicilina a AMX-S-oxidado (Gozlan *et al.*, 2013)

La degradación del anillo beta lactámico característico de las penicilinas en medio acuoso se cataliza y se incrementa por la presencia de ciertos metales como el, calcio, magnesio, mercurio,

zinc, cadmio, cobalto y cobre, así como también por la presencia de sustancias foto sintetizadoras naturales como los ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y nitratos (Gozlan *et al.*, 2010).

2.5.3 Contaminación del agua por amoxicilina

Los antibióticos son probablemente la familia más eficaz de fármacos desarrollados para mejorar la salud humana. Además de sus aplicaciones fundamentales, los antibióticos han sido utilizados para prevenir y tratar infecciones en plantas y animales, así como también son utilizados como promotores de crecimiento en la ganadería. En este último caso, los antibióticos como promotores se emplean a dosis sub terapéuticas durante largos periodos de la vida del animal, produciendo una ganancia de peso estimada alrededor del 5%. El mecanismo por el cual los antibióticos favorecen el crecimiento no se conoce con exactitud. Básicamente actúan modificando cuantitativamente y cualitativamente la flora microbiana intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades subclínicas. Actúan también reduciendo la flora normal que compite con el huésped por los nutrientes. Todo ello conduce a una mejora en la productividad y reduce la mortalidad de los animales (Torres y Zarazaga, 2002).

La amoxicilina particularmente pertenece a un grupo de fármacos que son excretados inalteradamente; por otro lado, también es uno de los antibióticos más vendidos y usados tanto para propósitos humanos como veterinarios en muchos diferentes países como: Italia, Alemania, Reino Unido y Holanda por citar algunos (Andreozzi *et al.*, 2004), por lo que es probable encontrar diferentes concentraciones trazas de amoxicilina en el medio ambiente.

2.5.4 Ocurrencia de amoxicilina

En la siguiente tabla se muestra los datos de ocurrencia de AMX (tabla 2)

Tabla 2. Datos de ocurrencia

País	Cuerpo de agua	Concentraciones	Referencias
Italia (Palermo)	Efluentes de plantas tratadoras de agua	0.0018-0.12 µg/L	Andreozzi <i>et al.</i>, 2004
Australia	Efluentes de plantas tratadoras de agua	0.28-6.94 µg/L	Watkinson <i>et al.</i>, 2009

Italia	Efluentes de plantas tratadoras de agua	0.622 µg/L	Zuccato <i>et al.</i> , 2010
España	Aguas superficiales, efluentes hospitalarios	0.9-1.67 µg/L	Fatta-Kassinou <i>et al.</i> , 2011

2.6 Efectos tóxicos en especies acuáticas

A continuación, se presentan algunos antecedentes referidos en la literatura internacional del efecto de amoxicilina en diferentes organismos acuáticos expuestos a diferentes concentraciones (tabla 1):

Tabla 3: Efecto de la amoxicilina y diferentes cuerpos de agua.

Autor	Investigación
Andreozzi <i>et al.</i> , 2004	Amoxicilina presenta toxicidad en alga verde azul <i>S. leopoliensis</i> (NOEC= 0.78µg/L; LOEC= 1.56µg/L; EC50=2.22µg/L) a las 96 horas a concentraciones de 50ng/L y 50mg/L
Brain <i>et al.</i> , 2004	Amoxicilina >1.0 mg/L (EC10) sobre <i>Lemna gibba</i> por 7 días
Li <i>et al.</i> , 2007	La amoxicilina tiene potencial de producir lesiones genómicas al ADN humano, por la inducción intracelular de especies reactivas de oxígeno a una concentración de 5mM a los 20 minutos, 60 min y 6 hr.
Park & Choi, 2008	CL50 de amoxicilina a las 96 hr para <i>Oryzias latipes</i> fue de 1000mg/L
Iannacone & Alvarino, 2009	CL50 de amoxicilina a las 96 horas para <i>Daphnia magna</i> fue de 6950 mg/L
Oliveira <i>et al.</i> , 2013	Efectos de la amoxicilina sobre embriones de <i>Danio rerio</i> , (deformaciones de la cola) a 0, 75, 128, 221, 380, 654, 125 mg/L durante 96 horas. Y en peces adultos a nivel enzimático produjo

Matozzo, Battistara, Marisa, Bertin, & Orsetti, 2016	<p>inhibición de actividad de CAT y GTS en músculo, branquias y cerebro a concentraciones de 0, 1, 10, 25, 50 y 100 mg/L durante 96 horas.</p>
Elizalde-Velázquez <i>et al.</i> , 2016	<p>Evaluación de los efectos de la amoxicilina sobre las actividades enzimáticas antioxidantes, la peroxidación de los lípidos y el contenido de carbonilo de la proteína en la almeja <i>Ruditapes philippinarum</i> y el mejillón <i>Mytilus galloprovincialis</i>. Bivalvos expuestos a 100, 200 y 400 AMX lg / L durante 1, 3 y 7 días.</p> <p>Estrés oxidativo y genotoxicidad inducidos por amoxicilina en <i>Cyprinus carpio</i> a concentraciones de 10 ng/L, 10 µ/L y 10 mg/L a diferentes tiempos de exposición (12, 24, 48, 72 y 96 h) y los siguientes biomarcadores fueron evaluados: lipoperoxidación (LPX), contenido de hidroperóxidos (HPC) y contenido de proteínas carboniladas (PCC), así como la medición de la actividad de enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).</p>

2.6.1 Como se introduce la amoxicilina al ambiente

La AMX tiene diferentes vías de entrada a los diferentes cuerpos de agua, las cuales se muestran en un esquema general en la figura 9.

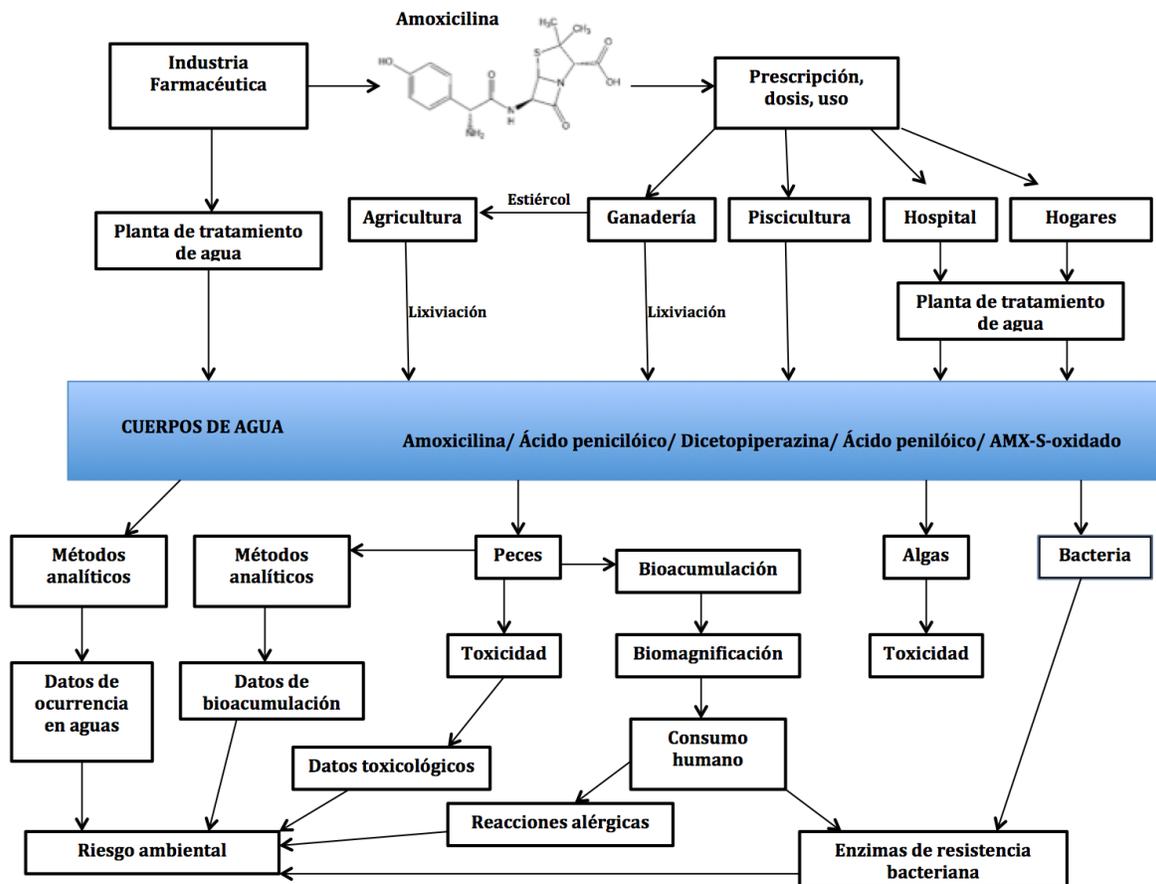


Figura 9. Posibles vías de entrada de AMX en el ambiente. **Fuente:** Elizalde *et al.*, 2016

2.6.2 Bioindicador

El concepto de organismo indicador se refiere a especies seleccionadas por su sensibilidad o tolerancia (normalmente es la sensibilidad). Son empleados debido a su especificidad y fácil monitoreo (Washington, 1984).

Las ventajas del uso de bioindicadores como herramienta para determinar la calidad del agua e implementar acciones sobre la recuperación son variadas, entre éstas se tienen (Cairns & Dickson, 1971):

- Las comunidades biológicas reflejan las condiciones del sistema (física, química, biológica y ecológica)
- El biomonitoreo permanente de las comunidades resulta ser económico comparado con los análisis fisicoquímicos.

- La información resultante puede expresarse por medio de Índices Bióticos que expresan la calidad del agua mediante escalas numéricas.

Los peces son considerados como excelentes bioindicadores de la calidad del medio acuático, debido a que tienen una gran interacción con el agua y sus sedimentos (De la Lanza *et al.*, 2000; Ondarza *et al.*, 2010).

En el caso concreto de los organismos acuáticos, la carpa es una de las especies más antigua del mundo, criada para consumo humano. México es uno de los países que más produce y comercializa esta especie; de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés), es la especie de mayor cultivo en el mundo y de mayor consumo alimenticio en la población (FAO, 2009^a).

Cyprinus carpio funge como un excelente bioindicador de la calidad del agua, esto se debe a su fácil reproducción, mantenimiento bajo condiciones de laboratorio, sensibilidad a diversos xenobióticos y resistencia a altas temperaturas, así como su importancia económica, nutricional y distribución geográfica (De la Lanza *et al.*, 2000; Ondarza *et al.*, 2010)(Figura 10).



Figura 10: *Cyprinus carpio*

1. Orden: *Cypriniformes*
2. Familia: *Cyprinidae*
3. Especie: *Cyprinus carpio* Linneaus,
4. Nombre común: Carpa común
5. Características: Peces de cuerpo robusto y alargado, boca grande y protráctil, con dos pares de barbillas en la boca, uno sobre el labio superior y el otro sobre las comisuras de los labios. Aletas pectorales en posición casi ventral, aletas pélvicas en posición posterior a éstas. Cuerpo cubierto por escamas grandes.
6. Distribución: Es una especie originaria de Asia, introducida a México; actualmente se encuentra en todos los cuerpos de agua dulce.

2.6.3 Composición nutricional de la carpa *Cyprinus carpio*

La carpa presenta un contenido graso de algo más de 5 g/100 g de porción comestible, por lo que se engloba dentro del grupo de pescados semigrasos; además de poseer proteínas de alto valor biológico. Su contenido vitamínico (algunas del complejo B: B2, B6, B12 y Vitamina E) representa cantidades poco significativas; sin embargo, la vitamina A está presente en cantidades destacadas en relación con el resto de pescados. En cuanto a los minerales, la carpa es uno de los pescados más ricos en hierro, aunque su valor se encuentra por debajo del que contienen las carnes. En relación con el fósforo, es el pescado más rico en este mineral, sólo por debajo del pez espada. En la Tabla 4 se puede ver reducidamente la composición nutricional de la carpa (Miranda, 2011).

Tabla 4. Composición química de la carpa en 100g de porción comestible

Elemento	Cantidad
Humedad (%)	77.7
Proteínas (%)	15.1
Grasas (%)	4.2
Cenizas (%)	1.2

El músculo de pescado puede ser de dos tipos: rojo y blanco; ambos son parecidos en composición, pero el músculo rojo tiene un mayor contenido de hemopigmentos, tales como la mioglobina para el transporte de oxígeno y más lípidos no estructurales para proveer energía, reflejando su papel en una fuerte actividad natatoria de especies como el atún o la caballa. El músculo rojo está situado a lo largo de los laterales del cuerpo, debajo de la piel, seguido por el músculo blanco.

Dependiendo su función y solubilidad, las proteínas del músculo del pescado se pueden dividir en tres grupos:

1. **Proteínas estructurales** (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina), que constituyen el 65-80% de la proteína total, las cuales dan al músculo su estructura y actividad. Estas proteínas son solubles en disoluciones salinas de concentración superior a 0,3 M.
2. **Proteínas sarcoplásmicas** (mioalbúmina, globulina y enzimas), que son solubles en agua y se encuentran normalmente en el plasma de las células, constituyendo entre el 18-20% del total de proteínas musculares.

3. **Proteínas del tejido conectivo** (estroma), representan alrededor del 3-5% del total de las proteínas, son solubles en disoluciones salinas muy concentradas, o mediante la cocción.

La propia naturaleza de los diferentes tipos de músculo refleja su importancia en la elaboración de productos marinos. Las proteínas sarcoplásmicas, al ser muy solubles, no contribuyen a la formación de geles, a diferencia de las proteínas miofibrilares, que confieren la estructura de geles por acción del calor; mientras que las proteínas del estroma, que se solubilizan por calor, pueden ser componentes “inertes” en los productos finales (Estrada, 2005). De igual manera, el músculo de pescado, contiene un intervalo de 1-5 % de lípidos, del cual, el 90% son fosfolípidos. Los lípidos en los alimentos provenientes del mar, tienen significativamente niveles más altos de ácidos grasos omega-3. El agua, principal componente de la fracción comestible de los peces, siendo mayor la retención de agua en el pescado fresco, pues durante la cocción se pierde aproximadamente un cuarto de humedad.

Posee Vitaminas y Nutrientes inorgánicos: vitaminas hidrosolubles, el complejo B y C; vitaminas liposolubles A, D, K y E (Estrada, 2005).

2.6.4 Hábitat de la carpa común *Cyprinus carpio*

La carpa común silvestre (generalmente referida simplemente como 'carpa' en esta hoja de información) vive en las corrientes medias y bajas de los ríos, en áreas inundadas y en aguas confinadas poco profundas, tales como lagos, meandros y embalses de agua. Las carpas son principalmente habitantes del fondo, pero buscan alimento en las capas media y superior del cuerpo de agua. El mejor crecimiento se obtiene cuando la temperatura del agua está en el intervalo 23 °C y 30 °C. Los peces pueden sobrevivir períodos de inviernos fríos. Salinidades hasta alrededor de 5‰ son toleradas. La gama de pH óptimo es 6,5-9,0. La especie puede sobrevivir bajas concentraciones de oxígeno (0,3-0,5 mg/L) así como súper saturación. Las carpas son omnívoras, con una gran tendencia hacia el consumo de alimento animal, tal como insectos acuáticos, larvas de insectos, gusanos, moluscos y zooplancton.

El crecimiento diario de la carpa puede llegar a ser 2 a 4 por ciento del peso corporal. Las carpas pueden alcanzar 0,6 a 1,0 kg de peso corporal dentro de una estación en los estanques de cría de peces en policultivo de áreas subtropicales/tropicales. El crecimiento es mucho más lento en la zona templada: ahí los peces alcanzan pesos corporales de 1 a 2 kg después de dos a cuatro estaciones de crianza.

2.7 Producción de carpa *Cyprinus carpio*

La carpa (*Cyprinus carpio*) es una de las especies de peces domesticados más antigua del mundo, criada para consumo humano. Su éxito se sustenta en su fuerza, rápido crecimiento, fácil propagación, hábitos omnívoros, resistencia a las enfermedades y tolerancia a un amplio rango de condiciones climáticas. En México es una de las especies altamente comercializadas; de acuerdo a estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés), es la especie de mayor cultivo en el mundo y de mayor consumo alimenticio en la población (FAO 2011; Zsigmond et al., 2009; Balon, 2006). Dentro de la producción mundial México ocupa el 7° lugar con 20,000 ton/año (Figura 11).

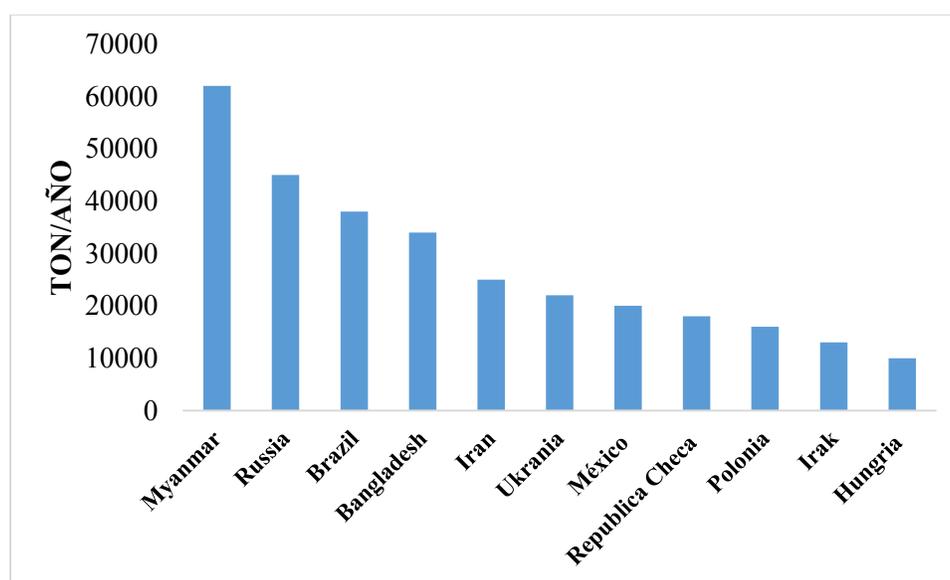


Figura 11. Principales países productores de *Cyprinus carpio* FAO (2009).

2.7.1 Biomarcadores

La respuesta tóxica se representa mediante la selección adecuada de biomarcadores. Estos son definidos como cambios cuantificables representativos en la respuesta biológica, física o química, que pueden estar relacionados con los efectos tóxicos o la exposición a químicos ambientales, y cumplen con las siguientes características (van der Oost *et al.*, 2003):

1. Indican la presencia de un contaminante biodisponible, más que la forma inerte del mismo.

2. Pueden revelar la presencia de un contaminante que no se sospecha que existe en el lugar de estudio.
3. Son más fáciles de innovar y más económicos que los análisis químicos comunes.

Los biomarcadores de pueden clasificar en tres grupos (van der Oost *et al.*, 2003):

1. De exposición: la detección y cálculo de sustancias exógenas o sus metabolitos o el producto de una interacción entre un toxón y una célula blanca y es calculada dentro del organismo. Este tipo de biomarcador es usado para confirmar la exposición de individuos o poblaciones a una sustancia en particular.
2. De efecto: incluyen la valoración bioquímica, fisiológica y otras alteraciones dentro de un tejido o fluidos corporales de un organismo que puedan ser reconocidos y asociados con deficiencia de la salud.
3. De susceptibilidad: indica la habilidad adquirida por un organismo para responder a los cambios producidos por la exposición a un agente específico, incluyendo factores genéticos y cambios en receptores los cuales alteran la susceptibilidad del organismo expuesto.

2.7.2 Estrés oxidativo

En la vida de los organismos aerobios, existe el peligro de que sus defensas antioxidantes se vean sobrepasadas por las fuerzas oxidantes. Esta situación se denomina estrés oxidativo y se relaciona con distintas enfermedades, así como con el envejecimiento (Mayor Oxilia, 2010).

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe de existir entre las sustancias o valores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas de oxígeno. Un aumento de los radicales libres puede generar daños a las biomoléculas como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto, se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos (Rodríguez *et al.*, 2001; Ames *et al.*, 1993).

El estrés oxidativo está relacionado con la patogénesis del cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, artritis reumatoide, isquemia, apnea obstructiva del sueño y otras enfermedades. Además, está relacionado con los mecanismos del envejecimiento, debido a un incremento progresivo en los procesos regulatorios mediados por los radicales libres que da como resultado cambios en la expresión de genes.

El daño genético se define con mayor precisión en términos de lesiones estructurales específicas que se producen a lo largo del ADN. Existen tres clasificaciones principales de los daños:

- a) La mutagénesis se refiere a mutaciones de un gen, que son cambios en la secuencia de ADN dentro de un gen.
- b) Clastogénesis refiere a los cambios en la estructura de los cromosomas, por lo general resulta en una ganancia, pérdida o reordenamiento de piezas cromosómicas
- c) Aneuploidía se refiere a la ganancia o pérdida de cromosomas intactos.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) están involucradas en los procesos de daño, no sólo porque son capaces de interactuar de manera directa sobre el ADN, sino también porque afectan la transducción de señales, la proliferación celular y la comunicación intracelular.

2.7.3 Radicales libres

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas, o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera gran inestabilidad y desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas que se producen por diferentes mecanismos como la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales moléculas del organismo. Los radicales libres (RL) más importantes de las células aerobias (como las células humanas), son el oxígeno, el súper óxido, los radicales de hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y los metales de transición. Los RL que se forman dentro de las células pueden oxidar las biomoléculas (moléculas empleadas dentro de las células, en especial a los lípidos) y por tanto producir la muerte celular, es importante destacar que el ADN es muy sensible a la oxidación por los radicales libres (Venero, 2002).

2.7.4 Especies Reactivas de oxígeno

Se consideran como (ERO's) el oxígeno atómico (O) y el ozono (O₃), al oxígeno singulete (¹O₂) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados de O₂ y al superóxido (O₂^{·-}), al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y al radical hidroxilo (·OH) que son especies parcialmente reducidas. Las ERO's en bajas concentraciones estimulan el crecimiento de las células, de algunas bacterias y de otros microorganismos, además de que son indispensables para la diferenciación celular y la muerte celular programada (Konigsberg, 2008).

El (¹O₂) reacciona con la mayoría de los compuestos celulares, con la membrana plasmática, los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono muy cerca del sitio donde se forma. Interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos siendo el producto principal la 8-hidroxi guanina.

El (O₂^{·-}) es a la vez un anión y un radical, se produce principalmente en la cadena respiratoria. Es tóxico para la célula porque a partir de él se puede originar el (¹O₂) y el (H₂O₂). El (H₂O₂) se forma cuando uno de los electrones del (O₂) se ha apareado con un electrón de giro contrario. Puede formar aductos con los hidratos de carbono, aminoácidos y bases nitrogenadas. Es tóxico debido a que puede formar (¹O₂) y (·OH), asociado a la reacción con algunos metales de transición con los que produce el radical (·OH) que interacciona irreversiblemente con las proteínas y el ADN.

El (·OH) se produce principalmente por la reacción de Fenton. Es uno de los compuestos más reactivos que existen, puede oxidar a las bases púricas y pirimídicas, así como a la desoxirribosa, además puede producir rupturas en el ADN. También reacciona con cualquier aminoácido en el sitio que se origina, incluso con los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Otras fuentes endógenas de ERO's interiormente de las células son las enzimas oxidativas como triptófano dioxigenasa, xantino de oxidasa y el CYP450 reductasa, que pueden producir (O₂^{·-}), mientras que la enzima guanidinciclasa y glucosa oxidasa generan peróxido de hidrógeno. Los contaminantes son una fuente importante para la generación de ERO's en los organismos, tal es el caso de los metales de transición, herbicidas, quinonas y compuestos nitroaromáticos., conocidos ampliamente por la generación de estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2006).

2.8 Efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas

2.8.1 Lipoperoxidación

La oxidación lipídica por los RL se lleva a cabo mediante una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula

vecina. Este proceso es conocido como lipoperoxidación y genera numerosos subproductos, muchos de ellos como el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos para evaluar el estrés oxidativo.

La lipoperoxidación o peroxidación lipídica puede ocurrir por vía enzimática como no enzimática, es una reacción autocatalítica donde las especies reactivas del oxígeno o radicales libres (RL) sustraen átomos de hidrógeno a las moléculas de ácidos grasos poliinsaturados, es decir, que atacan a los residuos de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, ya que altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. Los RL destruyen a la membrana lipídica, produciendo una variedad de compuestos como alcoholes, aldehídos, y ésteres, los cuales pueden provocar mutagénesis y carcinogénesis, la reacción termina cuando dos moléculas de peróxidos colisionan entre sí o cuando reaccionan con algún antioxidante disponible.

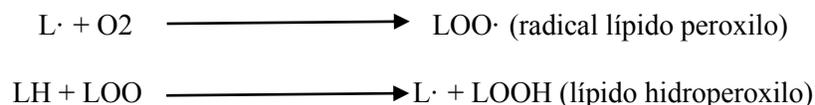
La determinación de los productos terminales de la peroxidación lipídica, entre ellos el malondialdehído, y la técnica de quimioluminiscencia constituyen métodos de amplio uso para evaluar el estrés oxidativo o el daño por radicales libres a las membranas celulares y las lipoproteínas (Valko *et al.*, 2005).

2.8.2 Etapas de la lipoperoxidación

Esté proceso está compuesto por un conjunto de reacciones en cadena, sobre los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006). Iniciación de la lipoperoxidación: comienza cuando un ácido graso poliinsaturado es atacado por una ERO que es capaz de absorber o retirar un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. El metileno queda como radical libre que se estabiliza mediante un rearrreglo molecular que da origen a un dieno que no reacciona con el siglete de oxígeno, sino con oxígeno molecular y forma el radical peroxilo.



Propagación de la lipoperoxidación: la molécula a la que se le ha abstraído un hidrógeno, hará lo mismo a la molécula de ácido graso poliinsaturado adyacente, estableciendo una reacción en cadena y de esta forma se propaga la lipoperoxidación a través de la membrana.



Terminación: la terminación de la lipoperoxidación es el resultado de la interacción de los radicales lipídicos y/o la formación de especies no radicales por los radicales lipidoperoxilo. El resultante – LOOH que puede descomponerse fácilmente a varias especies reactivas, incluyendo radicales lípidoalcoxil (LO), aldehídos (malondialdehído), alcanos, epoxi-lípidos y alcoholes (Valavanidis *et al.*, 2006).

2.8.3 Efectos de la Lipoperoxidación

Cuando reaccionan los radicales libres de ácidos poliinsaturados entre sí se pueden formar dímeros por entrecruzamiento o pueden ciclarse, creando aglomerados que conducen a la disminución de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana, modificando su estructura y con ello la función de las células y de los tejidos. De manera indirecta los productos de lipoperoxidación pueden reaccionar con otras moléculas como los aminoácidos y dañar a la célula (Konigsberg, 2008).

2.8.4 Daño genético (Genotoxicidad)

El daño genético se define con mayor precisión en términos de lesiones estructurales específicas que se producen a lo largo del ADN. Existen tres clasificaciones principales de los daños:

1) La mutagénesis se refiere a mutaciones de un gen, que son cambios en la secuencia de ADN dentro de un gen, 2) clastogénesis refiere a los cambios en la estructura de los cromosomas, por lo general resulta en una ganancia, pérdida o reordenamiento de piezas cromosómicas, 3) aneuploidía se refiere a la ganancia o pérdida de cromosomas intactos. Las especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) están involucradas en los procesos de daño, no solo porque son capaces de interactuar de manera directa sobre el ADN, sino también porque afectan la transducción de señales, la proliferación celular y la comunicación intercelular.

Diversos contaminantes pueden causar lesiones al ADN de organismos acuáticos, dentro de las que se incluyen rupturas de cadena, daño en azúcares, modificaciones en las bases y entrecruzamientos, causando efectos adversos en la estabilidad del ecosistema, por lo que se han establecido diferentes métodos para evaluar alteraciones en el ADN:

- a) **El ensayo de cometa o electroforesis unicelular en gel:** es una técnica rápida y sensible en especies acuáticas ya que detecta un amplio espectro de lesiones en el ADN (Jha, 2008; Frenzilli *et al.*, 2009; Frenzilli y Lyon, 2013). Se puede evaluar el daño al ADN en células individuales, incluyendo rompimientos simples o dobles, sitios álcali lábiles y la escisión incompleta de los eventos de reparación. Su uso se ha extendido a una variedad de áreas,

incluyendo el monitoreo ambiental y ecotoxicología genética (Bolognesi & Cirillo, 2014). También se han incorporado al ensayo endonucleasas para detectar bases oxidadas, como la FPG y la ENDO III, dichas enzimas reconocen a las bases nitrogenadas púricas y pirimídicas oxidadas respectivamente (Migliore *et al.* 2002).

- b) **El ensayo de micronúcleos (MN):** es uno de los métodos más utilizados para medir los cambios cromosómicos estructurales y numéricos en diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo* (Bolognesi & Cirillo, 2014). El daño cromosómico después de la replicación celular representa un efecto asociado con la exposición a productos químicos genotóxicos. El ensayo de MN puede ser realizado en cualquier población de células en proliferación (Hayashi *et al.*, 1998; Bolognesi y Hayashi 2011).

2.9 Ciclo celular

El ciclo celular es el proceso por el cual la célula crece y duplica todas sus estructuras, incluyendo la información genética, para finalmente dividirse y dar origen a dos células hijas idénticas que repiten el proceso. Este empieza a partir de una célula que posee una cantidad muy baja de ATP, por lo que, la célula inicia una acumulación de ATP e incrementa su tamaño, eventos que ocurren durante la fase G1 que es la parte más larga del ciclo. Una vez que la célula tiene suficiente ATP y un tamaño adecuado se comienza la síntesis de ADN (replicación). En esta etapa denominada S, se obtiene una copia del ADN original. El proceso de síntesis consume una gran cantidad de ATP, por lo que es necesario un segundo periodo de acumulación de energía, denominada fase G2. La energía adquirida de la fase G2 es empleada para el proceso de mitosis. La progresión ordenada de las células a través de las diversas fases depende de las ciclinas, las CDK e inhibidores de las CDK. Las CDK se encuentran presentes en el ciclo celular, sin embargo, solo se activan al ser fosforiladas tras la unión de las ciclinas. En contraste, las ciclinas se sintetizan durante fases específicas del ciclo. La actividad de los complejos ciclina-CDK está regulada por los inhibidores de CDK. Existen dos clases principales, las familias Cip/Kip (p21, p27 y p57) y las INK4/ARF, su función es la de inactivar los complejos ciclina-CDK (Kumar *et al.* 2005).

El ciclo celular depende de la eficiencia en la transición de sus fases, durante procesos de estrés, es común que las células entren en pausa (puntos de control) hasta que se repara o, si el daño es excesivo, la célula recibe instrucciones de morir por muerte celular programada (apoptosis) Figura 12.

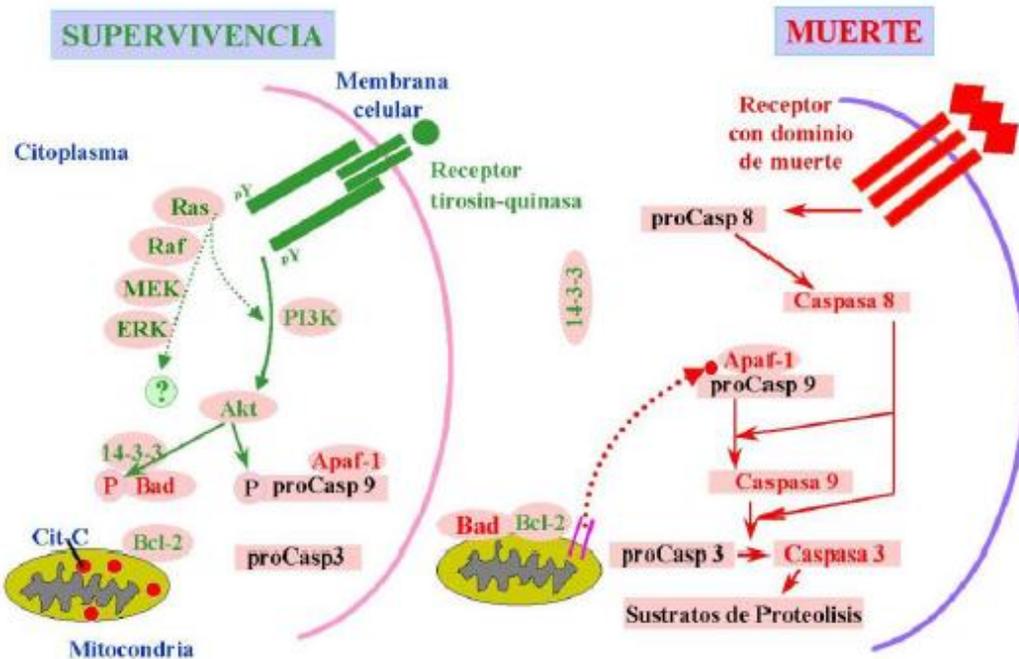


Figura 12. Esquema central de la apoptosis. En color verde se representan las moléculas antiapoptóticas y en rojo las pro-apoptóticas

El primer punto se presenta en G1/S en este momento se definen las condiciones adecuadas para la replicación, etapa que se denomina G1 – “arrest”. Si existe un daño al ADN, los sistemas de reparación se activan, retrasando la progresión del ciclo; si el daño es irreparable, se activan las vías apoptóticas. Esto impide la replicación de células que tienen daños en el material genético como mutaciones o rompimientos cromosómicos. El segundo punto se presenta en G2/M, donde se establece si el proceso de replicación del ADN fue exitoso y en caso negativo se desencadenan eventos para eliminar estas células (G2-“delay”). Cuando se activan los procesos de reparación del ADN durante la replicación, la fase S avanza muy lentamente, mientras que, si se interfiere con los procesos mitóticos, suele presentarse una pausa en la metafase para prevenir una distribución asimétrica de los cromosomas.

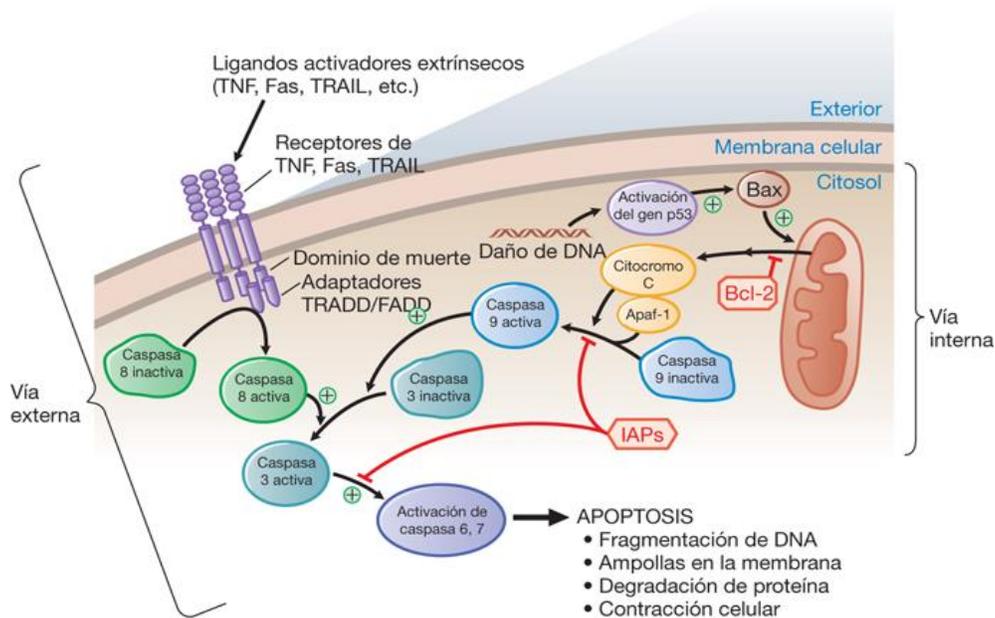


Figura 13. Dos vías que causan apoptosis. La apoptosis puede ser iniciada por ligandos externos como TNF, FAS o TRAIL en receptores transmembrana específicos unidad izquierda de la figura. La activación ocasiona trimerización del receptor y unión de las moléculas adaptadoras como TRADD al dominio de muerte intracelular. Que activa a la pro-caspasa 8 por vía externa y a su vez activa a la caspasa 3 ejecutora de la apoptosis. Esta última también puede iniciarse por la vía interna regulada por la familia Bcl-2 como Bax y Bcl-2. Bax es activada por el daño al ADN o por proteínas mal formadas a través de p53. La activación por esta vía ocasiona la liberación del citocromo-c de la mitocondria, formación de un complejo con Apaf-1 y caspasa 9. La caspasa 9 es activada en el complejo e inicia la apoptosis a través de la activación de la caspasa 3.

Para funcionar adecuadamente, los puntos de control incluyen sensores de daño, como proteínas de la familia RAD, y traductores, las familias CHK cinasa. Las moléculas efectoras de los puntos de control difieren dependiendo de la etapa, en G1/S, la detención del ciclo celular depende principalmente por p53, que induce al inhibidor del ciclo celular p21. La detención del ciclo de la célula por el punto de control G2/M implica mecanismos dependientes e independientes de p53. No obstante, la prolongación del tránsito en el ciclo celular contribuye a la supresión del crecimiento celular (figura 13) (Kumar *et al.* 2005; McCollum *et al.* 2006).

2.9.1 Citotoxicidad

La citotoxicidad es la evaluación *in situ* de la función celular en respuesta a una sustancia tóxica (Goguen and Kedersha, 1993). El daño al ADN induce la expresión de la proteína p53, la cual detiene el ciclo celular evitando la proliferación de células anormales, el incremento de esta proteína provoca la expresión de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Bax y PUMA), las cuales tienen como blanco la mitocondria en donde se induce al citocromo C. Este compuesto sale de la mitocondria y activa la cascada de caspasas (Macip *et al.*, 2003). Las caspasas son una familia de proteínas pertenecientes al grupo de las cistein- proteasas, mediadores esenciales de los procesos de apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico, caracterizada por distintos cambios morfológicos, que incluyen condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, pliegues en la membrana plasmática, desensamble del citoesqueleto y contracción celular. La célula se rompe en pequeños fragmentos rodeados de membrana conocidos como “cuerpos apoptóticos”, los cuales son eliminados por fagocitosis, sin iniciar una respuesta inflamatoria (Kurokawa y Kornbluth, 2009). Por lo anterior, uno de los métodos que se usan para la identificación de células en apoptosis es el marcaje *in situ* del ADN fragmentado o marcación de cortes terminales con dUTP-biotinilados mediada por TdT (técnica de TUNEL) (Formigari *et al.*, 2007), la cual se basa en el marcaje de los extremos 3'OH libres generados durante la fragmentación del ADN en la muerte apoptótica, dicho marcaje se hace con nucleótidos acoplados a isocianato de fluoresceína (FITC), debido a la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (Negoescu *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos en relación con la genotoxicidad y citotoxicidad son considerados como indicadores útiles de los efectos de los contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos, ya que este tipo de efectos puede asociarse con trastornos orgánicos que pueden afectar a la fecundidad, la salud y el ciclo de vida de los organismos involucrados (Theodorakis *et al.*, 2000).

También se ha reportado en la bibliografía la producción de estrés oxidativo inducido por amoxicilina y está a su vez afectando las características fisicoquímicas (solubilidad, capacidad de retención de agua, capacidad de gelificación, análisis de perfil de textura (TPA), perfil de pesos moleculares SDS-PAGE) de organismos acuáticos.

2.9.2 Daño a proteínas

En caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas

peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones (Oteiza; 1995).

Muchas proteínas son capaces de tolerar gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función. La oxidación parcial y selectiva en algunos casos produce proteínas modificadas que pueden actuar como moduladores en algunas reacciones, favoreciendo la homeostasis celular, en este caso la oxidación tiene una finalidad fisiológica. Por otro lado, existe una gran cantidad de agentes oxidantes que pueden dañar a las proteínas. Uno de los daños que es utilizado como marcador de la oxidación directa de los residuos de lisinas, arginina, prolina y treolina. También pueden ser introducidos por reacciones con aldehídos (malonaldehído, 4-hidroxi-2-nonenal) producidos durante la lipoperoxidación o al incorporar un grupo carbonilo a la proteína al reaccionar residuos de lisina con azúcares reductores o de sus productos de oxidación (Konigsberg, 2008; Hangsber, 2002).

2.9.3 Antioxidantes

Todos los organismos soportan numerosos factores exógenos y endógenos de estrés oxidativo, por lo que existen sistemas antioxidantes de defensa regulables, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que protegen al organismo del estrés oxidativo.

Entre los enzimáticos destacan la superóxido dismutasa (SOD), esta enzima destruye el anión superóxido (O_2^-) mediante su transformación en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo que contribuye al mantenimiento del equilibrio fisiológico antioxidante-prooxidante. (Domínguez 2006), la catalasa (CAT) transforma al H_2O_2 en O_2 y H_2O a cualquier pH entre 4 y 11 existen catalasas monofuncionales que tienen una sola actividad y otras que son capaces de oxidar algunas moléculas pequeñas como etanol y metanol, y la glutatión peróxidasa (GPX) cataliza la reducción de peróxidos ($ROOH$, inclusive al H_2O_2) a alcoholes (ROH) (Ríos, 2003).

La GPX y glutatión reductasa (GRd) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GRd), y la CAT de otro (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y la GPX lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas. Además, algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón (IFN) y la interleucina-1 (IL-1) son capaces de inhibir la actividad de la GPX (Cisneros *et al.*, 1997).

La aparición y el impacto de la oxidación en los alimentos se ignoró durante décadas, sin embargo, actualmente se sabe que la oxidación de proteínas en los tejidos vivos desempeña un papel esencial en las enfermedades cronicodegenerativas. Esto ha propiciado un crecimiento del interés por estudiar la oxidación proteica, ya que puede tener un impacto en la calidad de la carne y el valor nutricional. Estudios recientes han contribuido tanto al conocimiento científico sólido sobre los mecanismos básicos de oxidación, como a las metodologías avanzadas para evaluar con precisión la oxidación proteica en los sistemas alimentarios. Algunos de estos estudios han proporcionado información sobre las reacciones involucradas en las modificaciones oxidativas experimentadas por las proteínas musculares, mientras que otros han identificado una variedad de productos derivados de proteínas de músculo oxidado, incluyendo enlaces cruzados y carbonilos, y el impacto de la oxidación en la funcionalidad de la proteína y en rasgos específicos de calidad de la carne (Lund *et al.*, 2011).

2.9.4 Propiedades funcionales de las proteínas del musculo de pescado

Por lo general las proteínas tienen una gran influencia sobre los atributos sensoriales del alimento, por ejemplo: las propiedades texturales y organolépticas de los productos cárnicos dependen en buena medida de las proteínas musculares (miosina y actina). La funcionalidad de las proteínas alimentarias se define como aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios durante el procesado, el almacenamiento, la preparación y el consumo (Vera, 2010).

En otras palabras, las propiedades funcionales de las proteínas para el procesado son atributos que, a concentración adecuada del componente respectivo o aditivos y en condiciones apropiadas, proveen de ciertas características deseables al producto. Estas propiedades de las proteínas son el resultado de su interacción con el disolvente que las rodea, iones, otras proteínas, sacáridos, y lípidos, y en fenómenos de superficie (Miranda, 2011). En la tabla 4 se muestran las propiedades funcionales de las proteínas.

Tabla 5. Propiedades funcionales de las proteínas

INTERACCIONES DE PROTEÍNAS CON

AGUA	AGUA Y PROTEÍNAS	LÍPIDOS y GASES
Hinchamiento	Inducción de viscosidad	Capacidad de emulsificación

Rehidratación	Gelificación	Estabilidad de emulsificación
Retención de agua	Formación de fibras	Habilidad espumante
Solubilidad	Formación de masas	Estabilidad espumante

Fuente: Miranda, 2011

De las propiedades de las proteínas destacan cuatro, las cuales se describen a continuación.

2.9.5 Solubilidad

La solubilidad es la propiedad funcional más importante en alimentos, tanto si se busca aumentarla como si se desea evitarla. Sin embargo, debido a su tamaño, las proteínas no forman soluciones en el sentido estricto, sino suspensiones o soles. En muchos casos, como en los productos emulsificados, la proteína debe ser soluble para ser funcional (Hall, 1996).

La solubilidad de la proteína está determinada por los aminoácidos presentes en la superficie de la molécula y por el balance entre las interacciones energéticas dentro de la proteína, así como entre la proteína y el solvente. La superficie de una proteína soluble en agua ésta cubierta por aminoácidos polares que favorecen la interacción con el agua; las proteínas insolubles en agua tiene más grupos hidrofóbicos en la superficie (Creighton, 1993)

La solubilidad de las proteínas afecta diversas propiedades de las mismas, entre estas: espesantes, espumantes, emulgentes y gelificantes; por lo cual una proteína insoluble tendrá muy poco uso en el procesamiento de alimentos. La solubilidad de las proteínas depende de las interacciones iónicas e hidrófobas. Las primeras promueven las interacciones proteína- agua y aumentan la solubilidad y las segundas promueven la interacción proteína-proteína y disminuyen la solubilidad (Miranda, 2011). La solubilidad puede ser definida como el porcentaje total de proteína muscular que permanece en solución bajo condiciones específicas y que no es sedimentable bajo fuerzas moderadas de centrifugación. Por lo tanto, representa un estado de equilibrio entre el soluto (proteína) y el disolvente (Miranda, 2011).

Las principales variables que pueden alterar la solubilidad son: el pH, la temperatura y la fuerza iónica. Estas variables afectan la solubilidad de las proteínas por que causan alteraciones en los

grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, así como en las interacciones presentes en la estructura molecular de la proteína (Miranda, 2011). La solubilidad de las proteínas se ve incrementada a temperaturas de entre 0 y 40-50°C.; sin embargo, al elevar la temperatura, se da un incremento de la energía cinética afectando las interacciones no covalentes que mantienen estable tanto las estructuras secundarias como terciarias de la proteína provocando con esto su desnaturalización, exponiendo los grupos hidrofóbicos que se encontraban en su interior los cuales interaccionan entre sí, provocando que se dé una disminución de la solubilidad y así precipitando (Miranda, 2011).

La fuerza iónica determina la capacidad de las proteínas (por ejemplo, miofibrilares) para ligar agua y así poder entrar en disolución. Existen dos fenómenos que ocurren a diferentes fuerzas iónicas: la solubilización (salting-in) y la insolubilización (salting-out) (Miranda, 2011). La mayoría de las proteínas alimentarias son ácidas, por lo que exhiben una solubilidad mínima a pH 4-5 (punto isoeléctrico), debido a la ausencia de repulsión electrostática, y máxima a pH's alcalinos.

La desnaturalización por calor modifica el perfil de solubilidad de las proteínas frente al pH. Asimismo, a pH y fuerza iónica constantes, la solubilidad de la mayor parte de las proteínas suele incrementar con la temperatura entre 0°C y 40°C, exceptuando a las muy hidrófobas. Por encima de los 40°C se presenta la desnaturalización de la proteína, lo cual provoca un descenso de la solubilidad (Fennema, 2010).

2.9.6 Propiedades gelificantes

Un gel es un estado intermedio entre el estado sólido y el estado líquido. Técnicamente se define como un sistema sustancialmente diluido que exhibe un flujo de estado no estacionario, está formado por un entrecruzamiento de gruesas moléculas (polímeros) reticuladas por las uniones transversales (enlaces covalentes o no covalentes) formando una red inmersa en un líquido. Esta propiedad depende de la interacción agua-proteína. En esta estructura, el líquido impide que la red se rompa y por otro parte, la red mantiene atrapado al líquido; por lo cual las proteínas no pueden moverse. Esta transformación se ve facilitada por el calor, las enzimas o los cationes divalentes, en condiciones adecuadas. El papel de polímero es asumido por las proteínas miofibrilares, y el del solvente por el agua y sales minerales (Bucharles *et al.*, 1991).

La mayor parte de los geles proteicos alimentarios se preparan calentando una disolución de proteína. En este procedimiento de gelificación, la proteína en estado de solución se transforma primero en un “estado progel”, por desnaturalización. El progel suele ser un líquido viscoso en el que ya ha tenido lugar un cierto grado de polimerización. En esta etapa la proteína se despliega y se

expone un número crítico de grupos funcionales (como grupos hidrófobos y grupos formadores de puentes de hidrógeno) de forma que permita el inicio de la segunda etapa, es decir, la constitución de la red tridimensional proteica.

La formación del progel es irreversible, porque tienen lugar muchas interacciones proteína-proteína entre las moléculas desplegadas. Cuando el progel se enfría a temperatura ambiente o de refrigeración, el descenso de energía cinética térmica facilita la formación de enlaces no covalentes estables entre los grupos funcionales expuestos de las diversas moléculas; esto es lo que constituye la gelificación. Las fuerzas implicadas en la formación de la red son, fundamentalmente, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas. Las proteínas que contienen cisteína y cistina pueden polimerizar vía reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro durante el calentamiento, y formar una red covalente que continúa al enfriarse (Fennema, 2010).

Las proteínas globulares con pesos moleculares menores a 23,000 Da, no pueden formar un gel inducido por tratamiento térmico, a ninguna concentración razonable de proteína a no ser que contengan, por lo menos, un grupo sulfhidrilo o un enlace disulfuro. El pH óptimo para la formación de geles es de 7-8, para la mayor parte de las proteínas (Fennema, 2010).

2.9.7 Capacidad de retención de agua

Es una propiedad fundamental en la carne y productos cárnicos, ya que se relaciona con la jugosidad y ternura. El agua se asocia con la superficie de las proteínas por interacciones dipolo-dipolo y por puentes de hidrógeno, y forma una sola capa o monocapa en la superficie de las proteínas. Esta agua, que representa 0.3 gramos de agua por gramo de proteína, tiene propiedades diferentes al agua libre, y está fuertemente ligada a la proteína (Chinachoti, 2000). El resto del agua está adsorbida o atrapada en capilares, poros, células u otras estructuras y puede fluir libremente. La determinación de la retención de agua mide el agua libre y parte del agua adsorbida (Hui *et al.*, 2006).

La capacidad de retención de agua se define como la facultad de la carne de conservar el agua que le es propia o el agua añadida, bajo el efecto de una tensión cualquiera (Bucharles *et al.*, 1991). El tejido muscular contiene un 75% de agua, en donde el principal responsable de la retención del agua es el componente proteico. La mayor parte de agua en el músculo está en las miofibrillas. Esta propiedad se ve afectada por varios factores ambientales como la concentración de iones, presencias de ATP, pH, temperatura, tipo de sales y la conformación proteica. Las proteínas exhiben su

hidratación mínima a su punto isoeléctrico, al que las interacciones proteína-proteína minimizan la interacción con el agua (Fennema, 2010). La retención de agua de los concentrados proteicos aumenta en el intervalo de 20 a 100°C, en muchos casos, esto es debido a la formación de geles proteicos, en los que el agua se asocia con la superficie de las proteínas por puentes de hidrógeno y se atrapa dentro de los poros de la red proteica (Foegeding, 1989)

Las proteínas en las fibras musculares se asocian por cargas en la superficie de las moléculas proteicas. Al aumentar la concentración de sal, los iones de sodio y cloro se unen a los grupos cargados de las proteínas debilitando las interacciones entre fibras, lo que permite que entre más agua debido a que hay menos interacciones proteína-proteína y más interacciones proteína-agua (Vojdani, 1996).

Por este motivo la retención de sal tiene una gran influencia en la retención de agua. En los homogeneizados musculares aumenta la concentración de sal de 0 a 2 M NaCl a pH 6.0, las muestras homogeneizadas sin sal pierden agua, mientras que las homogeneizadas con 0.65M NaCl retienen más su peso en agua (Matsumura y Mori, 1996).

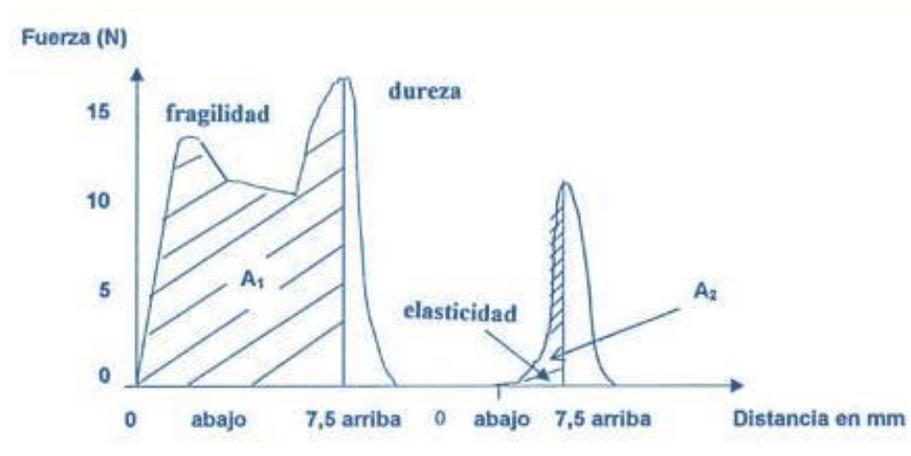
El pH de la solución también afecta a la retención de agua. Al igual que con la solubilidad, el pH influye en las cargas. En un homogeneizado muscular la retención de agua disminuye al mínimo en el punto isoeléctrico (pH 5.0, aproximadamente). En este momento la interacción proteína-proteína entre aminoácido cargadas es dominante. Si el pH se retira del PI la proteína se hace cada vez más cargada y las interacciones proteína-proteína ceden su lugar a proteína-agua (Chinacchi, 2000).

2.9.8 Perfil de textura

El análisis de perfil de textura (TPA) es un método objetivo correlacionado con el análisis sensorial de la textura. El ensayo comprende la compresión de una muestra dos veces seguidas, imitando el proceso de masticación.

Un pequeño cilindro de gel (aproximadamente 2cm de diámetro y 0.8cm de altura) se coloca sobre la plataforma de un texturómetro tipo prensa Instron, o similar. Sobre el mismo actúa un plato plano que lo comprime hasta una altura predeterminada. La determinación del perfil de textura involucra dos compresiones sucesivas del material a una velocidad constante durante las cuales se registra la evolución de la fuerza. En la figura 6 se muestra la curva típica de análisis de perfil de textura lograda en máquina Instron.

Figura 14. Curva típica de análisis de perfil de textura lograda en máquina Instron



Fuente: Bourne, 1978

Del análisis de las curvas de la figura 14 se logran cuatro parámetros texturales.

- Dureza (hardness) es definida como la fuerza pico logrado durante el primer ciclo de compresión.
- Cohesividad (cohesiveness) es definido como la razón del área positiva lograda durante la segunda compresión y del área positiva de la primera compresión (A_2 / A_1).
- Elasticidad (springiness antes llamado elasticity) es definida como la altura que recupera el alimento durante el tiempo que transcurre entre la primera y la segunda compresión.
- Gomosidad (Gumminess) es definida como el producto de dureza por cohesividad.

La calidad de un alimento es un concepto que el consumidor actual busca cuando adquiere cualquier tipo de producto alimenticio. Exceptuando la calidad nutricional y microbiológica de los alimentos, la calidad de estos se define como las características fisicoquímicas y funcionales de los mismos.

Las principales características fisicoquímicas de la carne son: color, textura, sabor y olor; y se relacionan con el pH y capacidad de retención de agua, la composición química, la degradación proteica, la interacción entre componentes y el grado de oxidación de las grasas. Por otro lado, Las propiedades funcionales de la carne se dividen en: propiedades de hidratación dependientes de las interacciones proteína-agua (retención de agua, adhesión); propiedades relacionadas con las interacciones proteína-proteína (formación de geles); y propiedades de superficie (emulsificación).

Las más importantes, debido a su aplicación en la industria alimenticia, son la emulsificación de grasa (CE) y la gelificación (CG), capacidad de retención de agua (CRA). Ésta última se define

como la capacidad que tiene la carne para retener agua, tanto propia como añadida, al someterse a una fuerza externa; el agua es retenida en el seno de una red de fibras musculares. Su importancia radica en estar directamente relacionada con la suavidad, la jugosidad y el color; depende del pH, los cambios *postmortem* y la presencia de sales. La CE se refiere a la habilidad de las proteínas cárnicas como agentes emulsificantes. Los productos de pasta fina se consideran como emulsiones del tipo aceite en agua, afectados por factores pre y *post rigor*, así como por el tipo y concentración de proteínas, y la relación proteína-grasa. La CG es el resultado de la desnaturalización y agregación de proteínas para formar una red ordenada; la miosina, la actina y en algunos casos la paramiosina, son las principales proteínas responsables de la formación de geles. La temperatura, el pH y las sales, al modificar la estructura cuaternaria o la distribución de la carga neta de las proteínas, afectan el grado de unión de las proteínas, alteran la naturaleza y la estructura de un gel.

Estas características se conjugan entre sí para producir la calidad tanto textural como sensorial. La textura se define por la forma en que los componentes estructurales de un material se arreglan en forma micro y macroscópica, y la manifestación externa de este arreglo. Por ejemplo, la cohesividad se refleja en la habilidad cementante de las proteínas miofibrilares en productos tales como jamones reestructurados (cocidos); el masajeo forma una película proteica alrededor de trozos de carne, la cual se torna cohesiva durante el calentamiento. El *sabor* es el resultado de una mezcla compleja de sensaciones percibidas por los sentidos del gusto y olfato, aunque en varias ocasiones se acompaña de estímulos visuales, táctiles y sonoros. El *sabor y olor* se producen por los compuestos volátiles liberados durante el procesamiento de la carne, y por los no volátiles encontrados en las partes magra y grasa de la carne. El *sabor y olor* a la vez están generados por precursores, por las interacciones entre los componentes químicos de la carne, y directamente por algunos compuestos.

Por otro lado, la AMX está relacionada con la calidad de la carne, se han hecho estudios, en los cuales se muestra que cuando este tipo de especies está en contacto no sólo con aditivos, medicamentos y con metales pesados, presentan una licuefacción del cerebro, por lo que se cree que también afecta la calidad fisicoquímica, textural y sensorial de su carne.

III. Justificación

La carpa común *Cyprinus carpio* es un pez de amplia distribución en México y el mundo, es de importancia económica y nutricional, y es conocido por el consumidor como una fuente de nutrientes como vitaminas liposolubles, proteínas ricas en aminoácidos esenciales, micro elementos y ácidos grasos insaturados que, entre otros beneficios tienen un efecto hipo-colesterolémico. Sin embargo, éstos pueden verse afectados por contaminantes como la amoxicilina, así como por su acción enzimática y microbiana, afectando características sensoriales (formación de compuestos volátiles desagradables), fisicoquímicas (capacidad de retención de agua, formación de bases volátiles), propiedades texturales (ablandamiento) y nutritivas (pérdida de nutrientes) del pescado. Actualmente la información toxicológica de la amoxicilina reportada en la literatura no es suficiente sobre sus efectos tóxicos (genotoxicidad y citotoxicidad) en especies acuáticas. Dado que este organismo al ser capaz de bioconcentrar contaminantes como la amoxicilina, podría afectar a dichas propiedades, así como a poblaciones que lo consuman por un proceso de biomagnificación, provocando reacciones alérgicas a las poblaciones susceptibles a las penicilinas, así como también un consumo no controlado de este antibiótico provocar resistencia microbiana. Por lo que es necesario llevar a cabo un estudio sobre la evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad inducida por amoxicilina y su influencia sobre la calidad alimentaria de esta especie de gran importancia.

IV. Hipótesis

Se sabe que el antibiótico amoxicilina es capaz de producir estrés oxidativo, será capaz de producir efectos de genotoxicidad y citotoxicidad, afectando su calidad alimentaria, al exponer a *Cyprinus carpio* en agua a diferentes concentraciones del antibiótico.

V. Objetivos

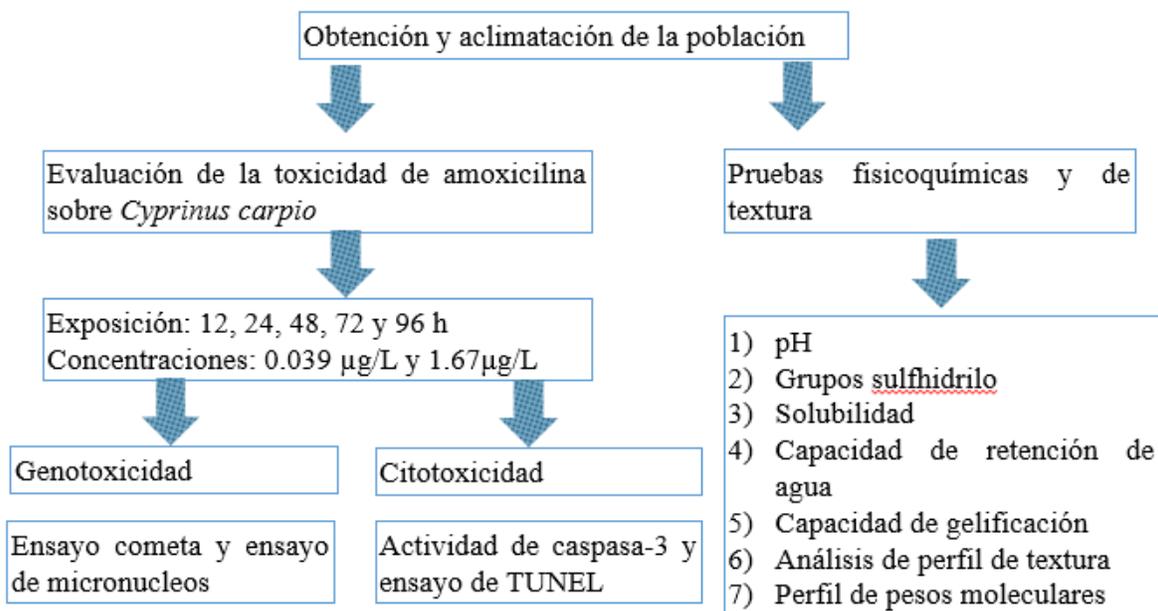
5.1. Objetivo general

Evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad inducida por amoxicilina y su influencia sobre la calidad alimentaria de *Cyprinus carpio*.

5.2. Objetivos específicos

- a) Determinar el daño genotóxico de la amoxicilina en sangre de *Cyprinus carpio* a través de la prueba de micronúcleos y cometa.
- b) Determinar el daño citotóxico de la amoxicilina a través de la actividad de caspasa-3 y prueba de TUNEL en sangre de *Cyprinus carpio*.
- c) Determinar la calidad alimentaria por medio de las pruebas fisicoquímicas (pH, capacidad de retención de agua, solubilidad, grupos sulfhidrilos, capacidad de gelificación, análisis de perfil de textura (TPA), perfil de pesos moleculares SDS-PAGE).

VI. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



6.1 Obtención y mantenimiento del organismo

Para realizar las pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad se emplearon como organismos de prueba *C. carpio* (carpa común). Los organismos fueron adquiridos en uno de los centros carpícolas más importantes del país (Tiacaque, Estado de México), donde se garantizó que los organismos estuvieran en buenas condiciones de salud, así mismo de que no estuvieron expuestos a ninguna sustancia que pudiera alterar su estado de salud. Posteriormente, los organismos fueron transportados al Laboratorio de Toxicología Ambiental, en bolsas de polietileno previamente provistas con agua y oxigenación. En el laboratorio las carpas se colocaron en peceras de 160 L durante quince días, a temperatura ambiente con periodos de luz y oscuridad natural, con aireación continua, pH de 7.4 y alimentadas diariamente con Pedregal Silver™ para peces.

6.1.1 Preparación del medio sintético para mantenimiento de *Cyprinus carpio*

Se disolvieron 2.85 L de agua destilada o desionizada, 120 mg L⁻¹ de MgSO₄ (Sigma-Aldrich), 174 mg L⁻¹ de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 8 mg L⁻¹ KCl (Vetec), en el orden descrito. Por otra parte, se agregaron 120 mg L⁻¹ de CaSO₄×2H₂O (Sigma-Aldrich) a 150 mL de agua destilada o desionizada en un matraz erlenmeyer de 250 mL. Se colocó la disolución sobre un agitador magnético hasta que el CaCO₄ se disuelva completamente. Se adicionaron a los 2.85 L preparados con anterioridad y se mezclaron perfectamente. Para valorar la calidad del agua reconstituida, se colocaron durante 24 h a 10 juveniles en una muestra; transcurrido el tiempo, para registrar la mortalidad.

6.1.2 Caracterización fisicoquímica del medio sintético para mantenimiento de *Cyprinus carpio*

El agua sintética se caracterizó por medio de la determinación del pH que se mide usando un potenciómetro de electrodo de vidrio (JENCO VisionPlus modelo pH6175), el oxígeno disuelto (usando un oxímetro Simpson-Electric Co. YST Modelo 51-B), la conductividad (Phmetro Conductronic Modelo TPM-PH130).

6.1.3 Diseño experimental

Para el experimento, se utilizaron organismos de 11.39 ± 0.31 cm de largo y un peso de 25.71 ± 2.8 g, y éstos fueron mantenidos en condiciones similares al periodo de aclimatación. Los ensayos de toxicidad consistieron en la incorporación de AMX a concentraciones de 0.039 µg L⁻¹ y 1.67 µg L⁻¹ (Kasprzyk-Hordern et al., 2007). Éstas, fueron seleccionados debido a que eran ambientalmente relevantes identificadas en un efluente urbano y en aguas superficiales. Se emplearon para las

pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad, 15 sistemas de prueba con 5 organismos cada uno de ellos: 1) cinco para la concentración 1 ($0.039 \mu\text{g L}^{-1}$), 2) cinco para la concentración 2 ($1.67 \mu\text{g L}^{-1}$) y 3) cinco correspondientes al grupo control (libres de AMX). Los tiempos de exposición empleados fueron 12, 24, 48, 72 y 96 h. El estudio se realizó por triplicado. En total fueron empleados en los experimentos 225 organismos de prueba. Al finalizar cada tiempo de exposición, los organismos fueron retirados de los sistemas y se colocaron en una pecera que contenía solución de xilocaína (0.02 mg mL^{-1}), con el fin de anestésiar a los organismos y obtener las muestras sanguíneas de la vena caudal con una jeringa hipodérmica de 1 mL previamente heparinizada. Con las muestras sanguíneas se realizaron los ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad, empleando las metodologías que a continuación se describen:

6.1.4 Evaluación de los efectos genotóxicos

Las alteraciones genotóxicas inducidas por AMX en células sanguíneas de *C. carpio*, fueron realizadas mediante la valoración de dos biomarcadores: 1) electroforesis unicelular (ensayo cometa) y 2) prueba de micronúcleos.

6.2 Ensayo cometa

La evaluación del daño genético mediante ensayo unicelular en gel (ensayo cometa) se realizó en 5 etapas consecutivas: 1) suspensión de linfocitos en agarosa, 2) liberación de DNA en solución de lisis, 3) electroforesis unicelular, 4) neutralización, y 5) tinción unicelular con bromuro de etidio.

Uno de los biomarcadores empleados para evaluar la genotoxicidad fue el ensayo cometa empleando la metodología propuesta por Tice et al., (2000). Previamente a un portaobjetos se adiciono una primera capa de 100 μL de agarosa normal al 1%. Después se mezclaron 10 μL de la suspensión de linfocitos con 75 μL de agarosa de bajo punto de fusión al 0.75% y 75 μL de esta mezcla se colocaron sobre la primera capa de agarosa.

Para la liberación de DNA se colocaron las laminillas por 1 h a 4°C en un vaso copplin con la solución de lisis (2.5 M de cloruro de sodio, 10 mM de trizma, 10% DMSO, 1% triton y pH 10, sigma). Posteriormente se colocaron en la cámara de electroforesis durante 20 min con una solución alcalina (300 mM de hidróxido de sodio, Merck y 1 mM de EDTA) a un pH de 13. Se realizó la electroforesis a 300 mAMP, 25 volts y $\text{pH} > 13$ por 20 min y finalmente el proceso se detuvo con un amortiguador de neutralización (0.4 M de trizma base) a un pH 7.4 (Tice et al., 2000)

Finalmente, el DNA se tiñó con 50 μL de bromuro de etidio y se observó al microscopio. La medición/cuantificación se realizó en un microscopio de fluorescencia (zeiss) con el programa Image-pro plus 5.0 (Media Cybernetics) y un filtro de onda de 450-490 nm. Se realizaron 100 mediciones por tratamiento y se obtuvo el daño por medio del ID, el cual es la relación de la longitud de la cola del cometa y el diámetro nuclear.

6.2.1 Ensayo de micronúcleos

Con una gota de la muestra sanguínea que se obtuvo de cada organismo, se realizó un frotis y se fijó con etanol puro por 5 minutos, y luego se tiñó con colorante de Giemsa al 10% (Hycel, DF, México) durante 9 minutos. Los resultados se expresaron como el número total de células micronucleadas por 1000 células (Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005)

6.2.2 Actividad de la caspasa-3

6.2.3 Preparación del extracto celular

Células Jurkat (ATCC # TIB-152) a 10^6 células mL^{-1} , y 50 ng mL^{-1} de mAb anti-Fas (clon # CH-11, MBL International, Cat. # SY-001) como control positivo (apoptosis inducida). Para las muestras de apoptosis inhibida (control negativo), se agregaron a las células 125 μL de Z-VAD-FMK [carbобензохи-валил-аланил-аспартил- (O-метил) -флуорометилкетона] (20 mM) al mismo tiempo que el mAb anti-Fas. Las muestras se incubaron en oscuridad 16 h a 37 ° C en una atmósfera humidificada con CO_2 al 5%. Posteriormente las células se obtuvieron mediante centrifugación a 450 g, 4 ° C y 10 min. El sedimento celular se mantuvo en hielo, se lavó con PBS a 4 ° C y se resuspendió en tampón de lisis celular a una concentración de 10^8 células mL^{-1} . Las células se lisaron por congelación y descongelación, luego se incubaron en hielo durante 15 minutos. Los lisados celulares se centrifugaron a 15.000 g, 4 ° C y 20 min, finalmente se recogió la fracción sobrenadante.

6.2.4 Ensayo colorimétrico

Se utilizó el kit (CaspACETM, Promega, Madison, WI), en donde el sustrato se une a la enzima liberando p-nitroanilina (pNA). Se utilizó una microplaca con pozos de fondo plano. El blanco se preparó utilizando 32 μL del buffer de caspasa [HEPES 312.5 mM, pH 7.5; sacarosa 31.25%; CHAPS 0.3125% (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato), 2 μL DMSO, 10 μL ditiotreitól (DTT; 100 mM) y 54 μL de agua desionizada. Para los grupos control y expuestos se

utilizó lo siguiente: 32 μL del buffer de caspasa, 2 μL de DMSO, 10 μL de DTT, 20 μL de sangre y 54 μL de agua desionizada; para el control positivo, 32 μL del buffer de caspasa, 2 μL de DMSO, 10 μL de DTT, 20 μL del extracto celular y 34 μL de agua desionizada; para las muestras donde se inhibió la apoptosis, 32 μL del buffer de caspasa, 2 μL de DMSO, 10 μL de DTT, 20 μL del extracto celular y 34 μL de agua desionizada. Después de que todas las soluciones habían sido adicionadas, se añadieron a cada pocillo 2 μL del sustrato DEVD-pNA. La microplaca se cubrió con parafilm y se incubó durante 4 h a 37 °C. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 405 nm y se calculó la actividad específica de la caspasa-3. Los resultados se expresaron como nM de pNA libre $\text{h}^4 \mu\text{g}$ de proteína.

6.3 Determinación de la concentración de proteínas totales

Se determinará mediante el método de Bradford (1976). A 25 μL del sobrenadante se le agregan 75 μL de agua desionizada y 2.5 mL del reactivo de Bradford (0.05 g de azul de Coomassie (Sigma-Aldrich), 25 mL de etanol (Sigma-Aldrich) al 96% y 50 mL de H_3PO_4 (Vetec) en 500 mL de agua desionizada). Se agitarán los tubos, se dejan reposar por 5 min y a continuación se determinará la absorbancia a 595 nm. Los resultados se extrapolan en una curva estándar hecha con albúmina.

6.3.1 Ensayo de TUNEL

Para identificar células en apoptosis, se empleó la prueba de TUNEL. En un tubo eppendorf se colocó una muestra de 300 μL de plasma sanguíneo (de carpas expuestas a concentraciones ambientalmente relevantes de AMX) y se centrifugó a 3000 g x por 5 min a 4°C. El sedimento celular que contenía linfocitos se resuspendió con 50 μL de solución de montaje. De esta solución, se colocó 1 μL en un portaobjetos previamente preparado con poli-L-lisina, y se dejó secar por 5 min a 60°C. Una vez seco el material celular, se fijó con acetona fría por 10 min y se hidrató colocando las laminillas en soluciones en serie de xileno-alcohol absoluto, al 96, 80, 70, 60, 50% (v/v) y finalmente 30 s en agua destilada. Las células hidratadas fueron adicionadas con 1 μL de proteinasa k ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se dejaron reposar por 10 minutos. Se realizaron tres lavados con PBS (NaCl 0.138 M, KCl 0.0027 M) pH 7.4 durante 1 min, se adicionaron 60 μL del buffer de equilibrio, posteriormente se realizó una incubación a 37 °C durante 1h, adicionando previamente 65 μL de la enzima TdT. Se realizó un lavado con PBS y se añadió el conjugado anti-FITC que se utilizó para el marcaje de las células, se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min. Se hizo un último lavado con PBS y finalmente se tiñeron con yoduro de propidio ($1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se examinaron en un microscopio de epifluorescencia con cámara digital.

El control negativo consistió en células tratadas como se describió anteriormente, pero sin la adición de TdT, y el control positivo consistió en células tratadas con DNasa I ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Se analizaron un total de 100 células por pez y la apoptosis se expresó como el porcentaje de células TUNEL positivas en 100 células.

6.3.2. Determinación de la concentración de proteínas totales

Los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad fueron normalizados sobre la base de la concentración de proteínas totales contenidas en la muestra sanguínea. Para dicho fin, este biomarcador se determinó mediante el método establecido por Bradford, (1976). Brevemente, a 25 μL del sobrenadante se le agregaron 75 μL de agua desionizada y 2.5 mL del reactivo de Bradford (0.05 g de azul de Coomassie, 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de H_3PO_4 , en 500 mL de agua desionizada). Se agitaron los tubos, se dejaron reposar por 5 min y a continuación se determinó la absorbancia a 595 nm. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar hecha con albúmina.

6.3.3-A) Determinación de la concentración de AMX en sangre de *Cyprinus carpio*

Para la determinación de AMX en sangre de carpa se emplearon los mismos sistemas utilizados para determinar los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad indicados en la sección 2.3. De los sistemas fueron tomadas muestras de agua de 5 mL, para realizar la determinación de AMX en agua en los diferentes tiempos de exposición. Para las muestras de sangre, una parte fue empleada para realizar los estudios de cito y genotoxicidad y la otra para hacer la determinación de AMX en sangre de *C. carpio*.

Para la determinación de AMX en agua y plasma, se preparó una solución estándar de AMX (50 $\mu\text{g/L}$) usando hidróxido de sodio en metanol (40 mM) en acetonitrilo al 50%. Se prepararon diferentes diluciones a partir de la solución stock para realizar la curva de calibración y estas soluciones fueron almacenadas a 4°C.

Para la determinación de AMX en plasma de *C. carpio* y en agua de los sistemas de exposición se empleó un equipo Shimadzu Prominence LC conectado a un sistema AB SCIEX API 3200 LC-MS/MS equipado con una fuente Turbo V y una sonda de ionización por electropulverización (ESI). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes: la columna utilizada fue una C18 Synergi (50 mm X 2mm; 2.5 μm de diámetro de partícula). La fase móvil fue ácido fórmico al 0.2%, ácido oxálico 0.1 mM en agua al 100% (A) y ácido fórmico al 2%, ácido oxálico 0.1 mM en acetonitrilo al 100% (B). Las condiciones de gradiente se utilizaron de la siguiente manera: primero aumentó de 0% a 75% de B en 1 min, segundo se mantuvo a 75% de B en 1.6 min

y luego nuevamente a 0% de B en 4.6 min. El tiempo de inyección fue de 7.2 min. Los parámetros cromatográficos empleados fueron los siguientes: tasa de flujo 0.3 mL min⁻¹, volumen de inyección de 20 µL. Las condiciones MS/MS fueron ionization TSI, ion spray voltage (IS): positive 35 V, nebulizador (ion source gas 1): 40 psi, dry-gas (ion source gas 2): 60 psi, dry- gas temperature: 400°C, colision gas (CAD): 5 psi, curtain-gas flow (CUR): 30 psi and scan type: positive multiple-reaction mode (+MRM). Los límites de detección y cuantificación fueron: LOD=0.116 ng/L y LOQ= 0.325 ng/L.

6.3.4-B) Correlación entre las concentraciones plasmáticas de AMX en *C. carpio* y los biomarcadores de geno y citotoxicidad

Se realizó una correlación plasmática entre ambas concentraciones de AMX: C1 (0.039 µg L⁻¹) y C2 (1.67 µg L⁻¹) y los biomarcadores de genotoxicidad (ensayo cometa y presencia de MN) y los de citotoxicidad (actividad de caspasa-3 y prueba de TUNEL). Dicha relación se realizó mediante un análisis de correlación de Pearson., empleando el programa Sigmastat v2.03.

6.3.5-C) Análisis estadístico

La normalidad de los datos y la homoscedasticidad se verificaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Se aplicó una prueba *post hoc de Bonferroni* para evaluar diferencias significativas, con $p < 0.05$. Para realizar dicho análisis se utilizó el programa Sigmastat v2.03.

6.4 Pruebas fisicoquímicas

pH, capacidad de retención de agua, solubilidad, grupos sulfhidrilos, capacidad de gelificación, análisis de perfil de textura (TPA), perfil de pesos moleculares SDS-PAGE.

6.4.1 Valor de pH (NMX-F-317-S-1978).

Se homogeneizaron 10g de muestra con 90mL de agua destilada. Se licuó hasta obtener una pasta consistente y uniforme, la disolución resultante fue filtrada y se ajustó la temperatura a 20 °C ± 0.5 °C. Finalmente se determinó el pH empleando un potenciómetro (Conductronic PH 120, México, México).

6.4.2 Capacidad de retención de agua

Se tomaron 5 g de concentrado proteico y se homogenizaron con 8 mL de una disolución de NaCl 0.6 M durante 1 min. La muestra se centrifugó a 6500 xg durante 15 min; la capacidad de retención de agua se presenta como los mL de una disolución de NaCl 0.6M retenidos por 1 g de concentrado proteico (Honikel *et al.*, 1980; Morachis *et al.*, 2015).

6.4.3 Solubilidad

Se tomaron 1 g de concentrado proteico y se homogeniza con 4 mL de agua destilada, se centrifuga la muestra a 6500 xg por 20 min, se emplea el método de biuret para determinar la proteína soluble en la fase líquida. El resultado se presenta como porcentaje de solubilidad; la concentración de proteína soluble respecto a la concentración proteica de 1 g de concentrado (Rawdkuen *et al.*, 2009).

6.4.4 Determinación de grupos sulfhidrilo libres.

Se tomó 1mL de una disolución proteica de concentración conocida (5mg/mL). Se adicionaron 9mL de una disolución de urea 8M (480g/L, utilizando como disolvente un amortiguador de pH 8.0, que contenía Tris-base 10.4g, glicina 6.9g y EDTA 1.2g por litro). Se mantuvieron las muestras en reposo durante 30 min. Se tomaron 3mL e un tubo de 13x100mm y se adicionaron 50 μ L de una disolución de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico (100 mg/25mL). Se dejaron reposar los tubos en oscuridad durante 30 min y posteriormente leídas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 412nm. La concentración de grupos sulfhidrilo fue determinada utilizando la siguiente ecuación (Ellman, 1959; Cortés-Ruiz *et al.*, 2015; Morachis *et al.*, 2015):

$$\mu M - SH / mg \text{ proteína} = \frac{75.53 * Abs_{412nm} * 10}{Concentración \text{ proteica (mg)}}$$

6.5. Capacidad de gelificación

Las muestras fueron ajustadas a una concentración de 50 mg/mL de proteína con un amortiguador de fosfatos 100mM pH 6.0, NaCl 0.6M y EDTA 20 mM. La gelificación se llevó a cabo en recipientes cilíndricos de vidrio empleando un proceso en rampas de temperatura: se mantienen las muestras a 40°C durante 30 minutos y posteriormente se incrementa la temperatura 1°C/min hasta alcanzar 75°C en el centro térmico. Se llevó a cabo un choque térmico en un baño con agua y hielo.

Los geles se almacenaron 24 horas en refrigeración (4°C) antes de ser evaluados (Rawdkuen *et al.*, 2009; Mahawanich *et al.*, 2010).

6.5.1 Análisis de perfil de textura (TPA)

Con los geles obtenidos de medidas estándar 20 mm de altura y 30 mm de diámetro se llevó a cabo el TPA en un texturómetro TA-XT2. Se empleó un ámbolo cilíndrico de 10 mm de diámetro, adaptado a una celda de carga de 25 kg, con una altura de compresión de 10 mm y una velocidad de deformación de 1 mm/s. Los parámetros que se evaluaron son los siguientes: dureza (gf), Cohesividad, elasticidad, masticabilidad, fibrosidad, resiliencia y gomosidad (Jafarpour y Gorczyca, 2008).

VII. RESULTADOS

7.1 Electroforesis unicelular (*Ensayo cometa*)

En la figura 15, se observa una tendencia al incremento del daño al ADN en comparación con el grupo control en la mayoría de los tiempos de exposición para ambas concentraciones. A la concentración de amoxicilina de 0.039 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C1), se identificó un incremento significativo para los tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 h con un porcentaje de 16%, 20%, 22%, 29% y 14% respectivamente con respecto al grupo control ($p < 0.05$). Para la concentración (C2) de 1.67 $\mu\text{g L}^{-1}$ al tiempo de 12, 24, 48, 72 y 96 h se observó un incremento significativo del 25%, 31%, 33%, 40% y 20%, con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Para la C1 se observaron incrementos estadísticamente significativos en los tiempos de exposición de 12 y 24 con respecto a las 72 h, con porcentajes de 13% y 9%, respectivamente. Para la misma concentración a las 96 h se observó un decremento estadísticamente significativo de 15% con respecto a 72 h ($p < 0.05$). Para la C2 se observó un incremento significativo a las 12h con respecto a las 72 h de un 15% y un decremento significativo de las 72 h con respecto a las 96h del 20% ($p < 0.05$).

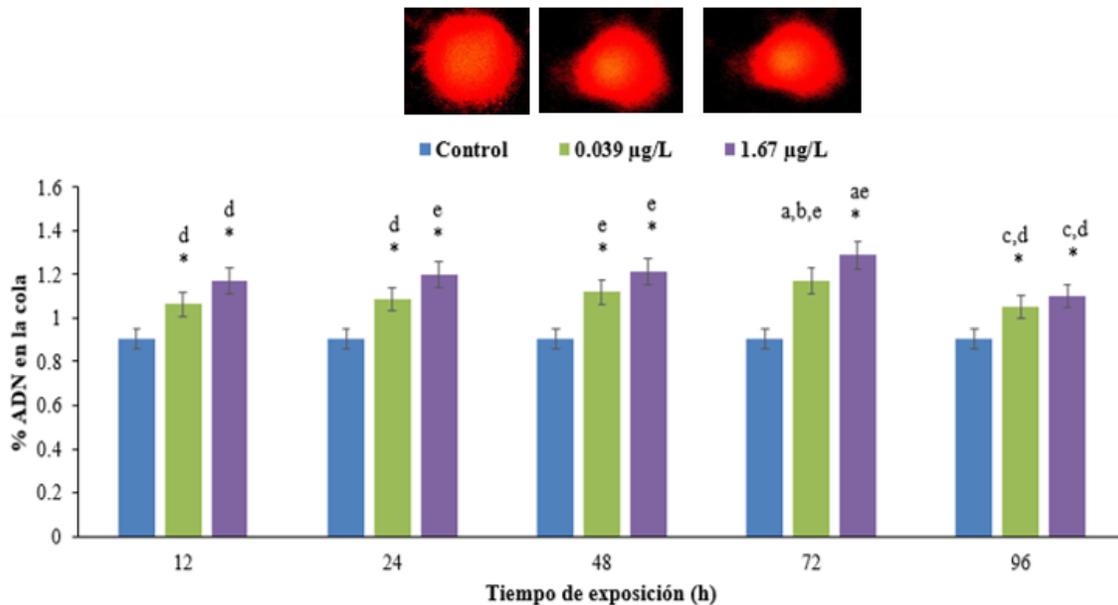


Figura 15. Determinación del daño al ADN mediante ensayo cometa en células sanguíneas de *Cyprinus carpio* expuestas a AMX. Las barras representan la media \pm SEM de los valores del índice de daño de cinco especímenes por concentración y por tiempo de exposición. El ensayo se realizó por triplicado. Significativamente diferente de: *grupo control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

7.1.2. Prueba de micronúcleos

En la figura 16, se observa una tendencia al aumento en los MN en comparación con el grupo control en la mayoría de los tiempos de exposición para ambas concentraciones. A la concentración de amoxicilina de 0.039 µg/L (C1), se observó un incremento significativo para los tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 h con porcentajes de 100, 200, 150, 205 y 136% respectivamente ($p < 0.05$). Para la concentración de 1.67 µg/L (C2) a los tiempos de 12, 24, 48, 72 y 96 h hubo un aumento significativo del 60%, 122%, 133%, 311% y 261%, respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Al comparar los tiempos de exposición, para la C1 se observó un incremento significativo a las 12 h con respecto a las 24, 48, 72 y 96 h con un 100, 50, 105 y 36% respectivamente. En el caso de la C2 (1.67 µg/L), se observó a las 72 h un decremento estadísticamente significativo a las 12, 24, 48 y 96 h de 151, 189, 178 y 50% ($p < 0.05$).

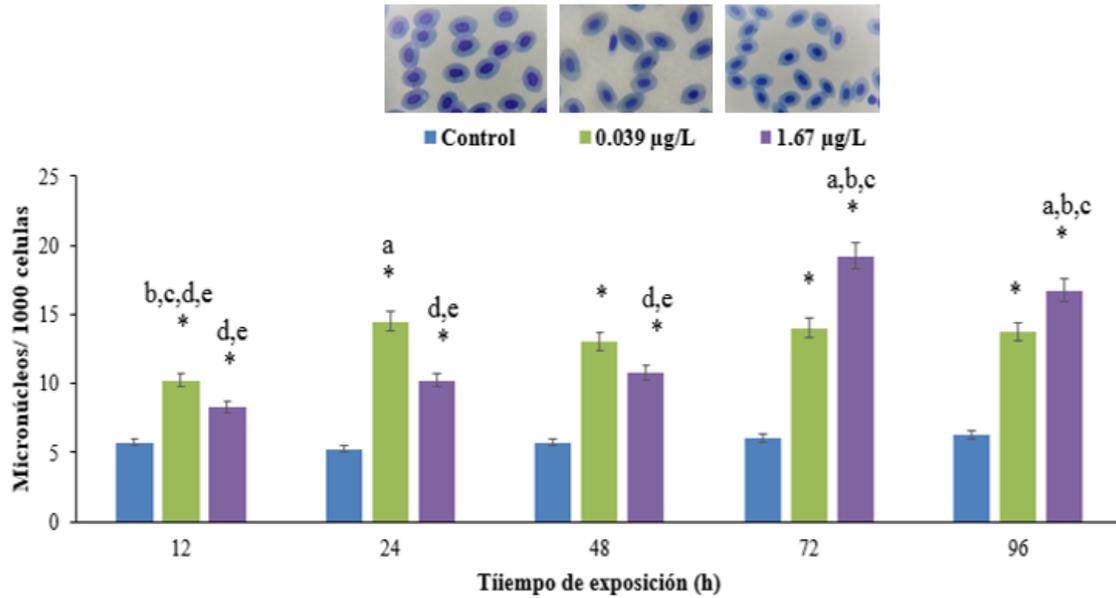


Figura 16. Frecuencia de micronúcleos en sangre de *Cyprinus carpio* expuesto a AMX durante 12, 24, 48, 72 y 96h. Los valores son la media de tres repeticiones \pm SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

7.1.3 Actividad de caspasa-3

En la figura 17 se identificaron alteraciones en la actividad de caspasa-3 con respecto al grupo control en la mayoría de los tiempos de exposición para ambas concentraciones. Se observó un incremento significativo respecto al control positivo para los tiempos de exposición de 72 y 96 h, con un porcentaje de 45% y 59% respectivamente en la C1 y un decremento significativo para las 12 h de 62% ($p < 0.05$). Para C2 se observó un aumento significativo de la actividad enzimática del 9%, 59%, 110%, 255% y 172% a las 12, 24, 48, 72 y 96 h respecto al control positivo ($p < 0.05$). Al comparar los controles con ambas concentraciones se observó que para C1 hubo incrementos significativos de 58%, 109%, 262% y 250% para las 24, 48, 72 y 96 h. En la C2 a las 12, 24, 48, 72 y 96 h se observaron incrementos de 155%, 150%, 281%, 787% y 500% respectivamente.

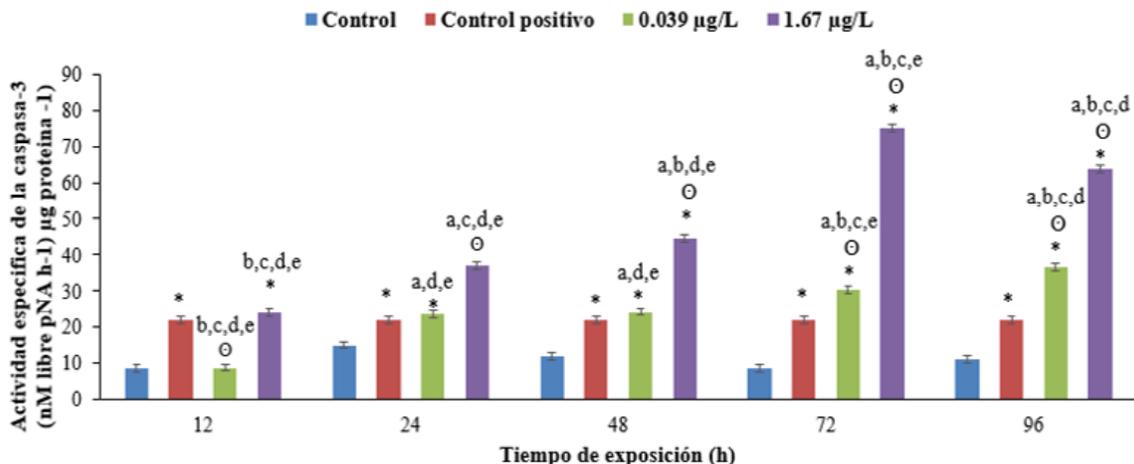


Figura 17. Actividad de caspasa-3 en sangre de *Cyprinus carpio* expuesta a AMX durante 12, 24, 48, 72 y 96h. Los valores son la media de tres repeticiones \pm SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; \odot Positive control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

7.1.4 Ensayo de TUNEL

En la figura 18 se muestra el porcentaje de células TUNEL-positivas presentando aumento significativo con respecto al grupo control en todos los tiempos de exposición para ambas concentraciones. Para la C1 se observaron incrementos estadísticamente significativos de 28%, 64%, 66%, 86% y 66% con respecto al grupo control a las 12, 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente. De igual forma para los mismos tiempos de exposición se observaron incrementos de 57%, 78%, 86%, 120% y 93% respectivamente para la C2 con respecto al control.

Al comparar ambas concentraciones con respecto al control positivo, se observaron disminuciones significativas ($p < 0.05$), para C1 de 75%, 70%, 65%, 64% y 65% y para C2 de 69%, 66%, 61%, 57% y 60% con respecto al control positivo a las 12, 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente ($p < 0.05$).

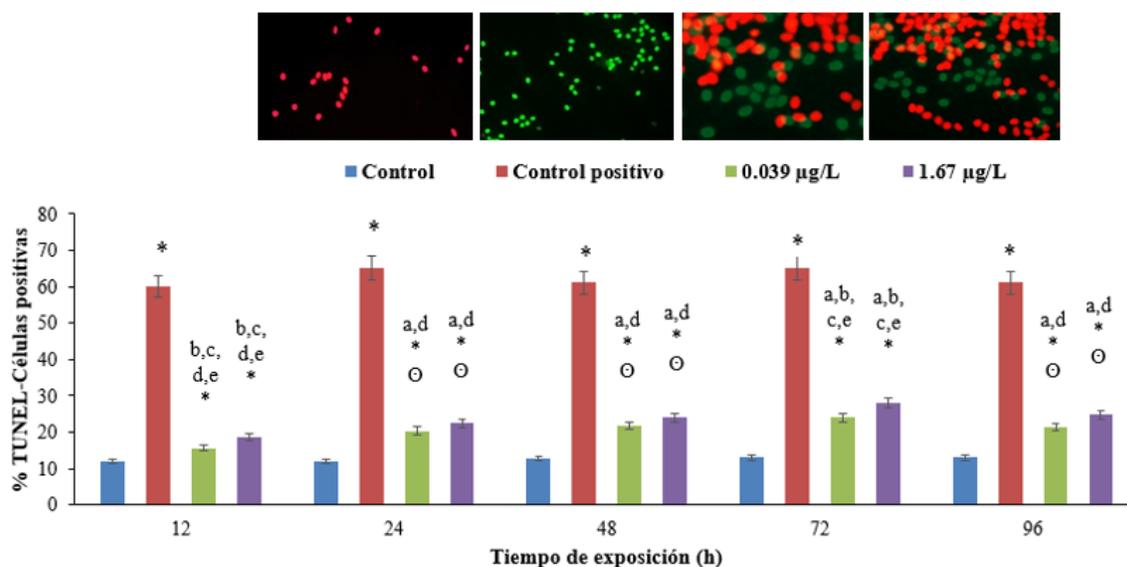


Figura 18. Determinación mediante ensayo de TUNEL del porcentaje de células apoptóticas en sangre de *Cyprinus carpio* expuestas a AMX durante 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones \pm SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ⊙ Positive control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (Bonferroni post hoc, $p < 0.05$).

7.2 Determinación de la concentración de AMX en agua y sangre de *Cyprinus carpio*

En la tabla 6, se indican los datos de concentraciones de AMX presentes en agua de los sistemas de exposición y en plasma de *C. carpio*, a los diferentes tiempos de exposición empleados. Como se puede observar, en agua al incrementar los tiempos de exposición se observa un decremento paulatino de la concentración de AMX en agua y un incremento en el plasma de la carpa.

Tabla 6. Cinética de la concentración de AMX en agua del sistema y plasma de carpa común *C. carpio*

Exposición a la concentración	Tiempo de exposición	de AMX en agua del sistema ng L ⁻¹	AMX en sangre de carpa <i>Cyprinus carpio</i> ng L ⁻¹
Grupo Control	12	ND	ND
	24	ND	ND
	48	ND	ND
	72	ND	ND

	96	ND	Nd
C1	12	28.1 ± 1.5	8.3 ± 0.8
0.039 µg L ⁻¹	24	22.2 ± 1.3	14.1 ± 1.1
	48	17.1 ± 1.8	19.3 ± 0.9
	72	14.3 ± 1.5	22.6 ± 1.2
	96	12.2 ± 1.8	25.1 ± 1.1
C2	12	1245.3 ± 2.6	321.3 ± 2.3
1.67 µg L ⁻¹	24	1023 ± 4.1	492.7 ± 3.6
	48	987 ± 5.2	581.6 ± 4.5
	72	715 ± 7.3	832 ± 7.3
	96	523 ± 6.4	992 ± 6.2

7.2.1 Correlación de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad con los niveles plasmáticos de AMX en carpa común *C. carpio*

En la tabla 7, se muestran los datos de la correlación entre los niveles plasmáticos de carpa *C. carpio* y los biomarcadores de cito-genotoxicidad observados en los diferentes tiempos de exposición. Como se puede observar, existe una mejor correlación entre los niveles plasmáticos de AMX carpa y los biomarcadores evaluados en la C1, el daño al DNA, presencia de micronúcleos y actividad de caspasa 3, fueron los más relacionados. En la C2, presencia de MN y presencia de apoptosis evidenciada con el ensayo de TUNEL fueron los mejor correlacionados.

Table 7. Correlación de las concentraciones de AMX con los biomarcadores de geno y citotoxicidad en sangre de *C. carpio*. Coeficiente de correlación >0.5.

Biomarcadores	Tiempo (h)	AMX	
		0.039 $\mu\text{g L}^{-1}$	1.67 $\mu\text{g L}^{-1}$
Ensayo cometa	12	-0.944	0.769
	24	-0.900	-0.990
	48	0.969	-0.035
	72	-0.472	-0.064
	96	-0.490	0.911
Prueba de micronúcleos	12	-0.240	-0.654
	24	0.240	-0.500
	48	1.000	-0.740
	72	0.970	0.740
	96	-1.000	-0.981
Actividad de Caspase-3	12	0.895	0.417
	24	-0.500	0.938
	48	0.500	-0.176
	72	1.000	-0.424
	96	1.000	-0.038
Ensayo de TUNEL	12	0.993	0.327
	24	0.327	0.397
	48	0.654	0.500
	72	⁶⁹ -0.500	0.500
	96	-0.327	0.327

7.2.2 Pruebas fisicoquímicas

7.2.3 pH

En la figura 19, se observa el comportamiento del pH a los cinco tiempos de exposición mostrando un incremento con respecto al control, para la concentración de 0.039 µg/L a las 12 horas de exposición arrojando un valor de 2.3% y un decremento significativo a las 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (1.43, 2.72 y 2.43% respectivamente); con respecto a la concentración de 1.67 µg/L se observó un incremento con respecto al control a la 12 y 24 horas arrojando los siguientes valores (2.15 y 1% respectivamente) y un decremento a las 48, 72 y 96 horas con los siguientes valores (2, 1.72 y 2.58% respectivamente). Al comparar los tiempos de exposición, para la C1 se observó un decremento significativo a las 12 h con respecto a las 24, 48, 72 y 96 h con un 2.38, 3.64, 4.90 y 4.62% respectivamente. En el caso de la C2 (1.67 µg/L), se observó a las 72 h un decremento estadísticamente significativo a las 24, 48 y 96 h de 4.07, 3.79 y 4.63% ($p < 0.05$)

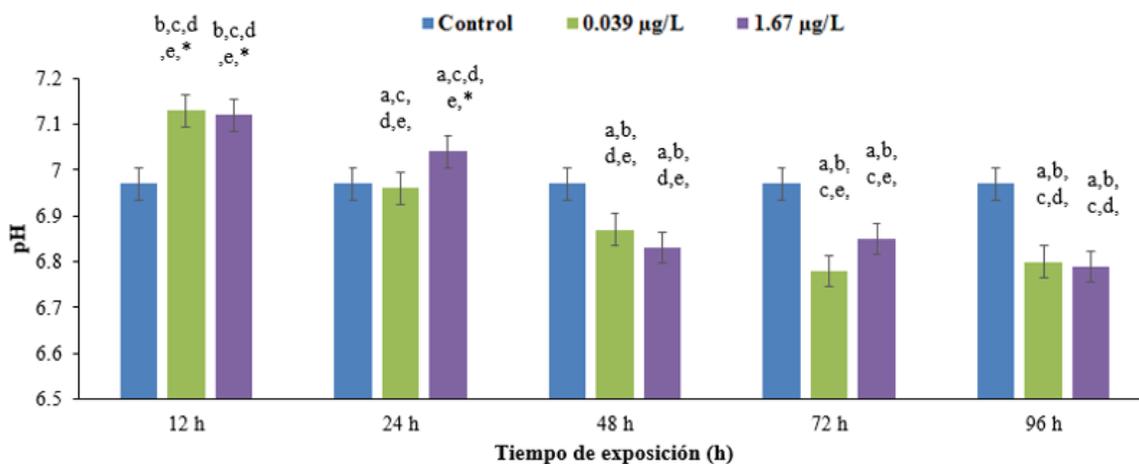


Figura 19. Determinación de pH en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a AMX durante 12, 24, 48, 72 y 96h. Los valores son la media de tres repeticiones \pm SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (Bonferroni post hoc, $p < 0.05$).

7.2.4 Capacidad de retención de agua

La Figura 20 muestra la capacidad de retención de agua; observándose un decremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.039 µg/L a los tiempos de exposición

24, 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (1.29, 2.58, 4.51 y 7.09% respectivamente), no siendo así, para la concentración de 1.67 $\mu\text{g/L}$ la cual mostró un incremento significativo con respecto al control a tres tiempos de exposición (12,24 y 48 h) arrojando los siguientes valores (4.51, 2.58, 1.29% respectivamente), por el contrario para las 72 y 96 h de exposición presento un decremento del 1.93 y 8.38 %. Para los tiempos de exposición, para la C1 se observó un decremento significativo a las 12 h con respecto a las 24, 48, 72 y 96 h con un 1.92, 3.20, 5.12 y 7.69% respectivamente. En el caso de la C2 (1.67 $\mu\text{g/L}$), se observó un decremento estadísticamente significativo respecto a las 12 h, con un porcentaje de 1.85, 3.08, 6.17 y 12.34 % para los tiempos 24, 48, 72 y 96 h ($p < 0.05$).

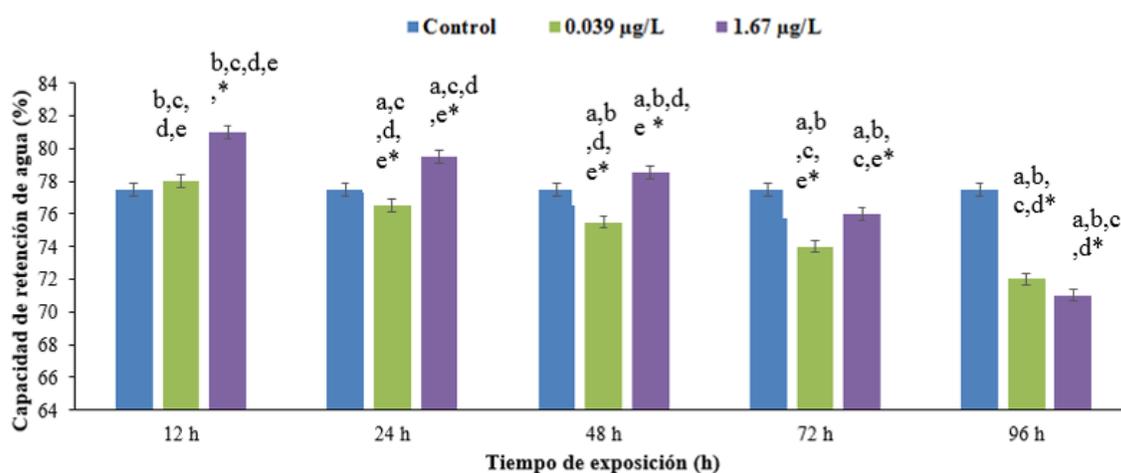


Figura 20. Determinación de capacidad de retención de agua en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a AMX durante 12, 24, 48, 72 y 96h. Los valores son la media de tres repeticiones \pm SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

7.3 Grupos sulfhidrilo

La Figura 21 muestra el contenido de grupos sulfhidrilos; observándose un decremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.039 $\mu\text{g/L}$ a los cinco tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (40.62, 12.5, 18.75, 25 y 34.37% respectivamente), no siendo así, para la concentración de 1.67 $\mu\text{g/L}$ la cual mostró un incremento significativo con respecto al control a los cinco tiempos de exposición arrojando los

siguientes valores (28.12, 34.37, 75, 31.25 y 25% respectivamente). Al comparar los tiempos de exposición, para la C1 se observó un decremento significativo a las 12, 48, 72 y 96 h respecto a las 24 h con un 32.14, 7.14, 14.28 y 25% respectivamente. En el caso de la C2 (1.67 µg/L), se observó a las 12, 24, 72 y 96 h un decremento estadísticamente significativo de 26.78, 23.21, 25 y 28.57% respecto a las 48 h de exposición ($p < 0.05$).

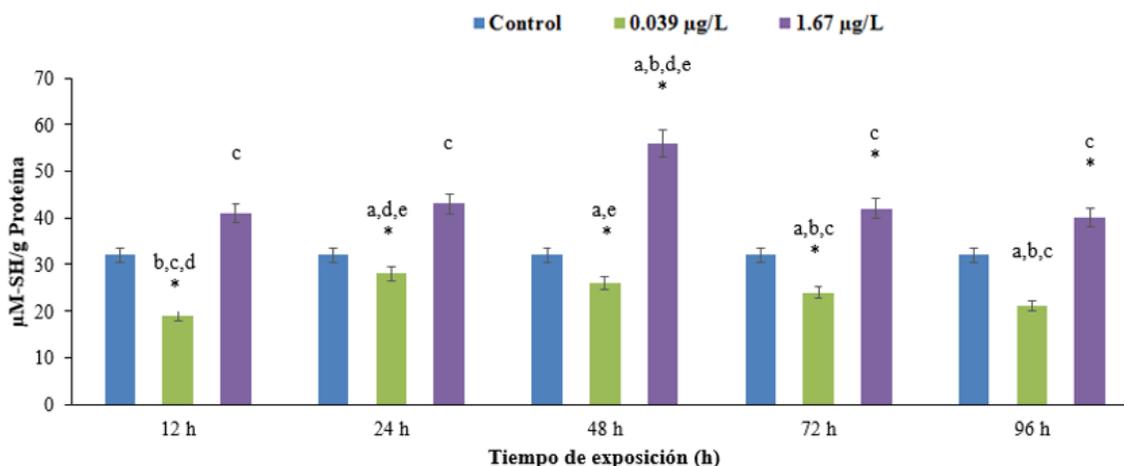


Figura 21. Contenido de grupos sulfhidrilo en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a AMX durante 12, 24, 48, 72 y 96h. Los valores son la media de tres repeticiones \pm SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

7.3.1 Solubilidad

La figura 22 muestra el comportamiento de la solubilidad; mostrando un decremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.039 µg/L a las 12, 24 y 48 horas teniendo los siguientes valores (52.94, 58.82 y 17.64% respectivamente) a las 72 y 96 horas se mostró un incremento arrojando los siguientes valores (11.76 y 5.88% respectivamente); para la concentración de 1.67 µg/L se observó un incremento a las 12, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (29.41, 5.88 y 11.76% respectivamente) y un decremento a las 24 y 48 horas de (23.52 y 11.76% respectivamente). Entre los tiempos de exposición, para la C1 se observó un decremento significativo a las 12, 24, 48 y 96 h con respecto a las 72 h con un 57.89, 63.15, 26.31 y 5.26%

respectivamente. En el caso de la C2 (1.67 $\mu\text{g/L}$), se observó a las 12 h un decremento estadísticamente significativo a las 24, 48, 72 y 96 h de 40.90, 31.81, 18.18 y 13.63% ($p < 0.05$)

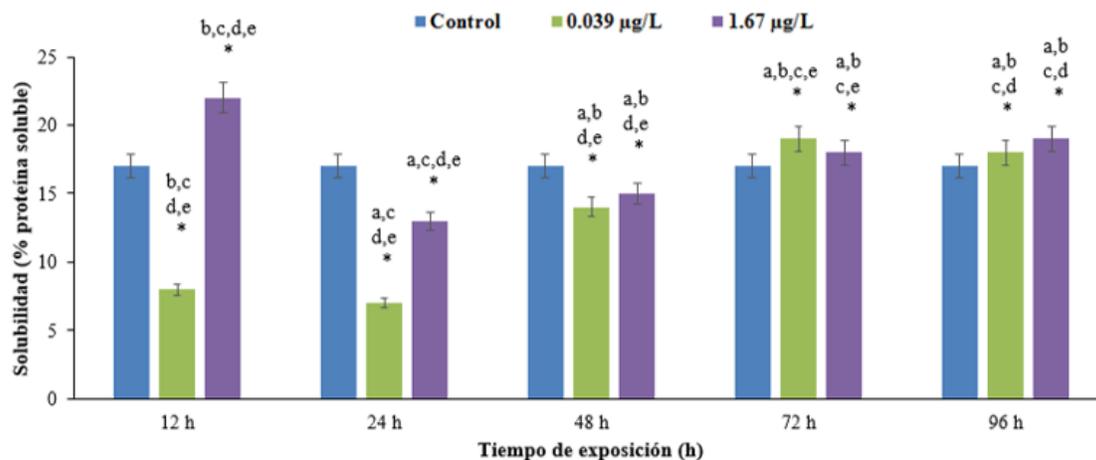


Figura 22. Comportamiento de la solubilidad en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a AMX durante 12, 24, 48, 72 y 96h. Los valores son la media de tres repeticiones \pm SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

7.3.2 Análisis de perfil de textura

La tabla 8 muestra el comportamiento del análisis de perfil de textura; mostrando un decremento significativo en dureza con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.039 $\mu\text{g/L}$ a las 12, 24, 48 y 72 horas teniendo los siguientes valores (6.61, 9.09, 10.74 y 3.30% respectivamente) a las 96 horas se mostró un incremento de 4.13%; para la concentración de 1.67 $\mu\text{g/L}$ se observó un incremento a las 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (8.26 y 11.57% respectivamente) y un decremento a las 12, 24 y 48 horas de (2.47, 4.13 y 7.43 % respectivamente).

La cohesividad mostró un incremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.039 $\mu\text{g/L}$ a los cinco tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (123, 107, 92.30, 130.76 y 146.15% respectivamente), para la concentración de 1.67 $\mu\text{g/L}$ se observó un incremento a los cinco tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (138.46, 161.53, 176.92, 192.30 y 223 % respectivamente).

El atributo de elasticidad mostró un decremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.039 $\mu\text{g/L}$ a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas mostrando los siguientes valores (12.76, 17.02, 25.53, 10.63 y 4.25 % respectivamente); para la concentración de 1.67 $\mu\text{g/L}$ se observó un incremento a las 96 horas de 6.38 %, y un decremento a las 12, 24, 48 y 72 horas teniendo los siguientes valores (6.38, 12.76, 17.02 y 2.12% respectivamente).

La masticabilidad mostró un decremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.039 $\mu\text{g/L}$ a las 12, 24, 48 y 72 horas teniendo los siguientes valores (1.27, 1.69, 3.68 y 2.26% respectivamente); para la concentración de 1.67 $\mu\text{g/L}$ se observó un decremento a las 12, 24, 48 y 72 horas teniendo los siguientes valores (0.84, 1.27, 4.10 y 1.13 % respectivamente), y un incremento para las 96 horas arrojando los siguientes valores (0.56 % respectivamente). Finalmente se determinó la gomosidad mostrándose un incremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) en el músculo a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas en la concentración de 0.039 $\mu\text{g/L}$ obteniendo los siguientes valores (100, 78.57, 64.28, 114.28 y 171.42 % respectivamente) y a para la concentración de 1.67 $\mu\text{g/L}$ a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas de (128.57, 157.14, 142.85, 200 y 192.85% respectivamente).

Tabla 8. Análisis de perfil de textura en musculo de *Cyprinus carpio* expuesto a AMX, 0.039 $\mu\text{g/L}$ y 1.67 $\mu\text{g/L}$, durante 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Tiempos de exposición

Parámetro	Muestra	12 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
Dureza	Control	1.21	1.21	1.21	1.21	1.21
	0.039 µg/L	1.13	1.10	1.08	1.17	1.26
	1.67 µg/L	1.18	1.16	1.12	1.31	1.35
Cohesividad	Control	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
	0.039 µg/L	0.29	0.27	0.25	0.30	0.32
	1.67 µg/L	0.31	0.34	0.36	0.38	0.42
Elasticidad	Control	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
	0.039 µg/L	0.41	0.39	0.35	0.42	0.45
	1.67 µg/L	0.44	0.41	0.39	0.46	0.50
Masticabilidad	Control	706	706	706	706	706
	0.039 µg/L	697	694	680	690	702
	1.67 µg/L	700	697	677	698	710
Gomosidad	Control	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
	0.039 µg/L	0.28	0.25	0.23	0.30	0.38
	1.67 µg/L	0.32	0.36	0.34	0.42	0.41

VIII. DISCUSIÓN

Este trabajo fue motivado, debido a que, en un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación, demostramos que la AMX fue capaz de generar la inducción de estrés oxidativo a concentraciones de 10 ng L⁻¹, 10 µg L⁻¹ y 10 mg L⁻¹ en cerebro, branquia, hígado y riñón de *C. carpio* (Elizalde-Velázquez et al., 2017). Como el estrés oxidativo ha sido relacionado con efectos genotóxicos y citotóxicos en peces (Anlas and Ustuner, 2016; García-Medina et al., 2013; Oliveira et al., 2013), nos surgió la idea de determinar si la AMX a concentraciones ambientalmente relevantes reportadas en la literatura mundial es capaz de inducir alteraciones citotóxicas y genotóxicas en células sanguíneas de *C. carpio*.

Existen algunos estudios que han demostrado la capacidad de AMX de generar alteraciones al DNA, genotoxicidad y citotoxicidad en mamíferos (Arabski et al., 2005; Fahmy et al., 2017; İstifli and Topaktaş, 2009; Li et al., 2007), sin embargo algunos de estos autores han demostrado que el daño al DNA puede iniciar a los 10 min (Li et al., 2007) pero a los 60 minutos o pocas horas se desencadenan los procesos de reparación disminuyendo el daño. En referencia, a los efectos genotóxicos inducidos por AMX en organismos acuáticos, pocos son los estudios que han asociado la presencia de AMX con daño o alteraciones al DNA y éstos se han realizado empleando concentraciones muy elevadas de AMX y que no son ambientalmente relevantes. Anlas and Ustuner, (2016) demostraron que a concentraciones de 320 mg Kg⁻¹ la AMX fue capaz de generar un incremento en la frecuencia de micronúcleos y daño al DNA empleando el ensayo cometa en *Oncorhynchus mykiss*. Estos autores atribuyen el efecto al estrés oxidativo y sugieren que el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede resultar en el fenómeno de apoptosis. Por otro lado, Oliveira et al., (2013), demostraron que la AMX a concentraciones de 75, 128 y 221 mg L⁻¹ indujo estrés oxidativo y alteraciones en la tasa de eclosión en embriones y adultos de zebrafish. Ellos refieren que en los adultos se presentó un decremento significativo en la actividad de la catalasa y una inducción de la enzima glutatión S transferasa.

Como podemos ver en los resultados, obtenidos en este estudio la AMX a concentraciones de 0.039 µg L⁻¹ y 1.67 µg L⁻¹ fue capaz de inducir daño al DNA demostrado con el ensayo cometa y la prueba de MN. Con el primer biomarcador se observan incrementos estadísticamente significativos de hasta 30% en la C1 y de 40% en la C2 y en la prueba de MN se observan incrementos de hasta 205% para C1 y de 311% para C2. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por los de

Anlas and Ustuner (2016), la diferencia en este estudio, es que se emplearon concentraciones mucho menores y ambientalmente relevantes. Los resultados obtenidos en ambos biomarcadores podrían ser atribuidos al fenómeno de estrés oxidativo, como lo hemos mencionado al inicio de este apartado, en un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación demostramos que la AMX es capaz de inducir estrés oxidativo en concentraciones bajas (10 ng L^{-1} y $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Las ROS, son capaces de generar modificaciones en las bases púricas y pirimidínicas DNA a especies como la 8-oxoguanina (8-oxoG), thymine glycol y el 5-hidroxi-metiluracilo. Cuando la lesión de 8-oxoG no se repara adecuadamente, genera rupturas simples o dobles y mutación en las bases GC-TA, lo que puede conducir a inestabilidad genómica (Grollman and Moriya, 1993).

Cuando se genera estrés oxidativo, como ya se ha demostrado previamente que la AMX puede inducir en diversas especies de peces como *C. carpio* y *Danio rerio* (Elizalde-Velázquez et al., 2017; Oliveira et al., 2013), hay una gran probabilidad de que la 8-oxoG se acumule en los telómeros por la elevada incidencia de residuos de guanina en las secuencias de DNA teloméricas (Coluzzi et al., 2014). Así mismo, los telómeros se reparan con menos eficiencia que el resto del genoma. También, la 8-oxoG inhibe la actividad de la telomerasa y disminuye la unión de las proteínas teloméricas a la secuencia de los telómeros, lo que conduce a la interrupción de la longitud, el mantenimiento y la función de los telómeros (Coluzzi et al., 2014; Houben et al., 2008; von Zglinicki et al., 2000). Es bien sabido que el estrés oxidativo induce rupturas de una sola hebra en el ADN telomérico. Los hallazgos arriba mencionados podrían explicar nuestros resultados obtenidos en el ensayo cometa. Por otro lado, la frecuencia de MN se vio fuertemente incrementada en el presente trabajo, la elevación de este biomarcador puede deberse a la ruptura del DNA o bien a la falta de segregación de los cromosomas, los eventos resultantes de los efectos aneugénicos y clastogénicos provocados por ROS (Canistro et al., 2012; SanJuan-Reyes et al., 2015).

En su estudio, Anlas and Ustuner (2016) mencionan que el incremento de micronúcleos y daño al DNA pueden ser provocadas por la producción de ROS y conducen a apoptosis celular, sin embargo esta hipótesis no es comprobada por dichos autores. En nuestros resultados, este hallazgo pudo ser comprobado empleando dos biomarcadores: 1) la actividad de la caspasa-3 y la prueba de TUNEL. La apoptosis es la muerte celular programada y sirve a las células como mecanismo para mantener su homeostasis; el inicio de este proceso puede ser el evento que genere citotoxicidad y diversas enfermedades (Köhler et al., 2002). Hay estudios que han demostrado que elevadas concentraciones de ROS, como H_2O_2 y el radical anión superóxido, pueden causar la oxidación de la caspasa-3 o

bien generan falla en la producción de energía por parte de la mitocondria, lo que resulta en daño celular (Asada et al., 2001; Espe et al., 2015; Yuan et al., 2003).

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la activación de la apoptosis inducida por múltiples estímulos, incluyendo el químico, como la presencia de la AMX. Es bien sabido que las mitocondrias son target y órganos blancos de las ROS (Makpol et al., 2012).

La caspasa-3 es una caspasa efectora en la que ambas vías de la apoptosis (intrínseca y extrínseca) convergen (Reyes-Becerril et al., 2018). El incremento de este biomarcador encontrado en *C. carpio*, también puede ser explicado porque las ROS inducidas por la exposición a AMX, inducen un cambio en el potencial de membrana con la consiguiente disminución de la producción de ATP y un aumento en los niveles de calcio (Yamamoto et al., 2002; Zhou et al., 2019). Las alteraciones al ADN y el aumento del calcio citosólico pueden iniciar la vía intrínseca. En ésta, el citocromo c y otras proteínas apoptogénicas en el citosol se liberan a través de la apertura de los poros mitocondriales regulados por la familia Bcl-2; todos estos fenómenos son provocados por la presencia de ROS. El citocromo c libre se une a Apaf1 (factor de activación de la proteasa apoptótica 1) formando un complejo multimérico que recluta y activa la procaspasa-9 (Gómez-Oliván et al., 2017; Verleih et al., 2019). La caspasa-9 activada promueve la activación del efector procaspase-3. La caspasa-3 es responsable de la escisión proteolítica de una amplia gama de targets celulares, y conduce a la muerte celular (Jin et al., 2019); el aumento de la actividad de esta caspasa se observa en los procesos apoptóticos. La apoptosis observada por exposición de AMX en *C. carpio* fue confirmada mediante la prueba de TUNEL, los resultados obtenidos demostraron un incremento significativo de las células apoptóticas positivas. El ensayo de TUNEL es un biomarcador muy eficaz que en la actualidad es empleado para detectar el daño al DNA *in situ*, este método tiene la capacidad de identificar en la célula las etapas iniciales el proceso de la apoptosis, además en las que ya se han generado cambios morfológicos, los cuerpos apoptóticos (Chen et al., 2018; Quan et al., 2019). En este caso, usamos como control positivo células tratadas con DNasa I, esta última es una endonucleasa que tiene la capacidad de inducir fragmentación de DNA (Fahmi et al., 2017; Zhdanov et al., 2015) , por lo que al comparar con el grupo control, observamos incrementos estadísticamente significativos. Sin embargo, al comparar el control positivo con las C1 y C2 se observaron decrementos significativos entre 57-75%. Pero ambas concentraciones mostraron incrementos estadísticamente significativos comparados con el grupo control, evidenciados con células apoptóticas positivas. Los resultados obtenidos en este biomarcador pueden ser explicados por las alteraciones al DNA producidas por las ROS inducidas por AMOX en

C. carpio y también confirman la apoptosis identificada con el incremento de la actividad de la caspasa-3.

Los resultados obtenidos en los biomarcadores como incremento en la actividad de la caspasa 3 y las células apoptóticas positivas inducidas por AMX en sangre de carpa común confirmarían los efectos citotóxicos de este antibiótico.

La correlación de Pearson entre las concentraciones de AMX en plasma de *C. carpio* y los biomarcadores de geno y citotoxicidad evaluados mostraron que en ambas concentraciones se observaron relaciones entre los niveles plasmáticos del antibiótico y el daño al DNA y la apoptosis presentados en células sanguíneas. Las respuestas máximas de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad se observaron a las 72h, y después a las 96h se observaron decrementos en los biomarcadores. Esto sería un reflejo de que los mecanismos de reparación en peces son mucho más ineficaces que los presentados en mamíferos, pero es deseable medir dichas respuestas a mayores tiempos.

Pruebas fisicoquímicas

pH

En la figura 19 muestra una disminución significativa de pH. Este decremento es debido al resultado de la acumulación de ácido láctico producido por glicólisis anaerobia que se lleva a cabo en el músculo, la cual disminuye los valores de pH, la cantidad de ácido láctico producido se relaciona con la cantidad del glucógeno almacenado en los tejidos, siendo este la principal fuente de energía en animales, la disminución de este compuesto es una respuesta del estrés inducido por pesticidas, metales y efluentes, incluyendo a los contaminantes emergentes (Cazenave 2014 *et al.*; Preto 2014 y Elizalde *et al.*, 2016) corroboran que la carpa común presenta estrés oxidativo en presencia de amoxicilina.

CRA

Se define como la habilidad de la carne de mantener el agua propia o añadida después de ser aplicada una fuerza externa (Lun *et al.*, 2008; citado en Lu 2016).

Es un parámetro cualitativo importante en la industria alimentaria para los atributos sensoriales, así como la influencia en el producto durante su procesamiento o almacenamiento, en la figura 20 se observó una disminución de la capacidad de retención de agua (CRA) a medida que incrementó el

tiempo de exposición. Lu, Wang, Luo (2016), menciona que la oxidación proteica fue un factor restrictor importante para la capacidad de las miofibrillas de absorber agua, el incremento de la acción proteolítica y el entrecruzamiento de las proteínas miofibrilares ha demostrado que puede afectar negativamente la CRA del músculo.

Algunas investigaciones han encontrado una correlación negativa entre la capacidad de retención de agua y la dureza de músculo de pescado Gault, (1985), así mismo Huff-Ionergan y Lonergan (2005) demostraron que la acción proteolítica y el entrecruzamiento disminuyen la capacidad de retención de agua.

Grupos Sulfhidrilos

La exposición a AMX tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en los grupos SH, probablemente debido al hecho de que la conversión de los grupos SH en puentes disulfuro es uno de los primeros eventos observables durante la formación de radicales mediados por oxidación de proteínas. La cisteína presente en el núcleo catalítico de la cabeza de miosina es quizás el residuo más susceptible a los radicales de oxígeno y el primero en ser oxidado (Park *et al.*, 2006). Por lo tanto, los enlaces disulfuro son de gran importancia en la conformación de la estructura terciaria de las proteínas, por lo que es termodinámicamente más estable cuando otras fuerzas de atracción son débiles confiriendo firmeza al músculo. Cuando se observa una mayor cantidad de enlaces disulfuro, las proteasas presentes son tal vez incapaces de llevar a cabo su función, disminuyendo así la degradación de las propiedades funcionales (Pilosoff, 2000).

Solubilidad

Es sabido que las propiedades funcionales del pescado como matriz alimentaria refleja las características bioquímicas de la miosina, que es el componente mayoritario de las proteínas miofibrilares, la estabilidad de las funciones del alimento en carne de pescado está relacionada al comportamiento de la miosina, Maitena *et al.* (2004), indican que el punto isoeléctrico del lado ácido de la miosina es debido a la pérdida de la carga de lisina por reacciones de oxidación con malonaldehído Estevez (2011).

En el caso de proteína soluble figura 22, se observó diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$) a las 12 horas en ambas concentraciones (0.039 $\mu\text{g/L}$ y 1.67 $\mu\text{g/L}$). Para los tiempos de exposición de 48, 72 y 96 horas, se puede apreciar un aumento en la solubilidad, en consecuencia, de la formación de nuevos agregados proteicos. Halliwell y Gutteridge (1999), observaron que uno

de los papeles fundamentales de las defensas antioxidantes, para la desintoxicación de la producción de especies reactivas del oxígeno pueden inducir un daño oxidativo significativo, que incluye la inactivación enzimática, degradación de las proteínas y oxidación de lípidos, en este caso se puede observar que el daño a las proteínas estarían obligando a la formación de nuevos enlaces entre la proteína, de tal manera que la proteína soluble disminuye para el caso de la especie expuesta a la 12 y 24 horas, probablemente llevando a cabo una conformación diferente de la estructura proteica.

La solubilidad de las proteínas (figura 22), van correlacionadas con la proteína soluble, ya que como se mencionó anteriormente, la presencia de amoxicilina, puede actuar a nivel proteico, pudiéndose dar un cambio en la conformación de la proteína, formándose nuevos enlaces proteína-proteína, formación de nuevas redes, enlaces iónicos, enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro (Kinsella *et al.*, 1985), de esta manera también podría existir una degradación proteica (Swaisgood, 1982) dando como consecuencia una mayor solubilidad.

TPA

La determinación de textura es una propiedad importante para el procesamiento tecnológico y es un buen indicador de las propiedades texturales de las proteínas miofibrilares del músculo porque no sólo afecta a los atributos sensoriales, sino también a los texturales. El TPA fue llevado a cabo para ambas concentraciones a diferentes tiempos de exposición, mostrando diferencias significativas con respecto al control para: dureza, cohesividad, elasticidad, masticabilidad y gomosidad, Badii y Howell (2002) una disminución en la dureza, elasticidad y masticabilidad durante las primeras 48 horas de exposición pueden estar relacionados con la desnaturalización de la proteína habiendo un mayor número de enlaces hidrógeno en la matriz proteica lo cual también explica la disminución en la capacidad de retención de agua. A partir de las 72 horas hubo un incremento en dureza cohesividad y masticabilidad lo que estaría indicando la formación de enlaces disulfuro.

IX. CONCLUSIONES

La AMX a concentraciones ambientalmente relevantes, 0.039 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 1.67 $\mu\text{g L}^{-1}$, fue capaz de generar alteraciones genotóxicas y efectos citotóxicos en células sanguíneas de la carpa común *C. carpio*. Como la AMX, es liberada de forma constante a los cuerpos de agua presenta riesgos para las especies de peces de interés económico como *C. carpio*. Los biomarcadores empleados pueden ser de utilidad y confiables para demostrar los riesgos de AMX, en especies acuáticas.

Los parámetros fisicoquímicos pH, porcentaje de acidez, capacidad de retención de agua, solubilidad, grupos sulhidrilo y disulfuros totales, y del análisis de perfil de textura de la carne de *Cyprinus carpio* mostraron diferencia significativa en los diferentes tiempos de exposición analizados, lo que se encuentra en concordancia con los resultados de genotoxicidad y citotoxicidad.

La amoxicilina fue capaz de inducir un daño genotóxico y citotóxico, al existir un daño a nivel genético conlleva a la afectación de órganos y tejidos, así como de las propiedades fisicoquímicas y texturales y una alteración de la calidad de la carne de *Cyprinus carpio*.

X. BIBLIOGRAFÍA

Aydin E, Talinli I (2013) Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey. *Chemosphere* 90:2004–2012

Alloway BJ, Ayres DC. 1993. Chemical principles of environmental pollution. Chapman and Hall. London 395 p.

Andreozzi R, Caprio V, Ciniglia C, De Chempdore M, Lo Giudice R, Marotta R, Zuccato E (2004) Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs: fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environ Sci Technol* 38:6832–6838

Barcelo, L.D., y Lopez, M. J., 2007 Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico-Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.

Bolognesi, C.; Cirillo, S. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators *Zoology* **2014**, *60*(2), 273-284.

Brain, R., Johnson, D., Richards, M., Sanderson, H., Sibley, P., 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ toxicol Chem* 23:371-382.

Bringolf RB, Heltsley RB, Newton TJ, Eads CB, Fraley SJ, Shea D, Cope WG (2010) Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environ Toxicol Chem* 29:1311–1318.

Cairns, J. y Dickson, K. L. 1971. A simple method for the biological assessment of the effects of the water discharges on aquatic bottomdwelling organisms. *J. Wat. Poll. Control Fed.* 43 (5):755-772.

CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. Agua. Disponible en: <http://www.cna.gob.mx> (citado 19/05/2015).

Daughton CG, Ternes TA (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107:907–938.

De la Lanza E. G., Hernández, P.S., Carbajal, P.J., 2000 “Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (Bioindicadores)” Plaza y Valdés S.A. de C.V., México, 17-190.

Fabbri E (2015) Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1340:20–28.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2009a “FishStat: Universal Software for fishery statistical time series” Data and Statics Unit, FAO, Rome.

Fent K, Weston A, Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76: 122–159.

Frenzilli, G.; Nigro, M.; Lyons, B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2009**, *681(1)*, 80-92.

Gil, J.M., Soto, M.A., Usma, J.I., Gutierrez, O.D. 2012 “Emerging contaminants in water: effects and possible treatments (reviwe article)” *Producción más limpia*, 7(2), 52-73.

Goguen, B.; Kedersha, N. Clonogenic cytotoxicity testing by microdrop encapsulation *Nature* 1993, *363(6425)*, 189-190.

Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC, Jorgensen SE (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere* 36:357–393

Hiriart, M.M. El agua como recurso. UNAM. Disponible en:<http://www.comoves.unam.mx/assets/revista/54/el-agua-como-recurso.pdf> (citado 12/05/2015).

Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* 225:109–118.

Iannacone J., Alvarino L., 2009 “Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*” *Ecología Aplicada*, 8(2), 71-80.

Jones O, Voulvoulis N, Lester J. 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, 36: 5013-5022.

Joint Nordic, 2014 “Screening of emerging pollutants: Strategy and results” Nordic Council of Ministers, Denmark, Copenhagen, Rosendahls Schultz Grafisk.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, hormones, and others organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211.

Ku“mmerer K (2009) Antibiotics in the aquatic environment—A review—Part I. *Chemosphere* 75:417–434.

Lalumera GM, Calamari D, Galli P, Castiglioni S, Crosa G, Fanelli R (2004) Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* 54:661–668.

Li, P.Y., Chang, Y.C., Tzang, B.S., Chen, C.C., Liu, Y.C., 2007, “Antibiotic amoxicillin induces DNA lesions in mammalian cells possibly via the reactive oxygen species” *Mutation Research* 629 (2007) 133-139.

Manzetti S, Ghisi R (2014) The environmental release and fate of antibiotics. *Mar Pollut Bull* 79:7–15.

Matozzo V (2014) Effects of pharmaceuticals on immune parameters of aquatic invertebrates. *ISJ-Invertebr Surviv J* 11:163–173.

Matozzo V (2016) Assessing the Effects of Amoxicillin on Antioxidant Enzyme Activities, Lipid Peroxidation and Protein Carbonyl Content in the Clam *Ruditapes philippinarum* and the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *ISJ-Invertebr Surviv J* 97:521–527.

Metcalfé CD, Miao XS, Koenig BG, Struger J (2003) Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the Lower Great Lakes, Canada. *Environ Toxicol Chem* 22:2881–2889.

Montejo, M.C. (2003) Estudio de estabilidad al estado sólido del clavulanato potásico y su combinación con amoxicilina trihidrato. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Oliveira R., McDonough S., Ladewig C.L.J., Soares M.V.M.A., Nogueira J.A.A., Domingues I. 2013. “Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*)” *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36. 903-912.

Ondarza, P.M., Miglioranza, K.S.B., Gonzales, M., Shimabukuro, V.M., Aizpún, J.E., Moreno, V.J., 2010 “Organochlorine compounds in common carp (*Cyprinus carpio*) from Patagonia, Argentina” *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 5(1), 41-47.

Park JI (2005) Pharmaceuticals in the environment and management approaches in Korea. Korea Environment Institute, Korea, pp 1–135.

Park, S., Choi, K., 2008. "Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems". *Ecotoxicology* 17, 526-538.

Petrovic M, Sole M, de Alda MJL, Barcelo D (2002^a) *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2146.

Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs). *Chemosphere* 65:725–759

SAGAN. Contaminación del agua. Disponible en:http://www.sagangea.org/hojared_AGUA/paginas/17agua.html (citado 12/05/2015).

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149.

Washington, H. G. 1984. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. *Water Research*. 18(6):653-694.

Zheng Q, Zhang R, Wang Y, Pan X, Tang J, Zhang G (2012) Occurrence and distribution of antibiotics in the Beibu Gulf, China: impacts of river discharge and aquaculture activities. *Mar Environ Res* 78:26–33.

XI. ANEXOS

Thank you for your submission to Chemosphere

¿Tienes demasiado correo? Cancelar suscripción



Chemosphere <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Vie 12/04/2019 08:43 PM

Leobardo Manuel Gomez Olivan



*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Gomez Olivan,

Thank you for sending your manuscript Genotoxic and cytotoxic alterations induced by environmentally-relevant concentrations of amoxicillin in blood cells of *Cyprinus carpio* for consideration to Chemosphere. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for Chemosphere to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can viewed here: http://journalinsights.elsevier.com/journals/0045-6535/review_speed

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
 2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Chemosphere, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".
- Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".
3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/CHEM>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: `lmgomez@uaemex.mx`

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/CHEM/automail_query.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Chemosphere.

Kind regards,

Jacob de Boer
Shane Snyder
Co-Editors in Chief

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone: <http://support.elsevier.com>

April 12, 2019

Jacob de Boer PhD, Shane Snyder PhD
Co-Editors-in-Chief
Chemosphere

Dear colleagues:

Enclosed please find the manuscript entitled "*Genotoxic and cytotoxic alterations induced by environmentally-relevant concentrations of amoxicillin in blood cells of Cyprinus carpio*", to be considered for publication in the journal *Chemosphere*. All of the authors have read and approved the manuscript.

Thanking you in advance for your kind attention, I remain

Sincerely yours,



Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván
Laboratorio de Toxicología Ambiental
Departamento de Química
Universidad Autónoma del Estado de México
Fax: (+52 722) 2173890
E-mail: lmgomezo@uaemex.mx, lgolivan74@gmail.com

**Genotoxic and cytotoxic alterations induced by environmentally-relevant
concentrations of amoxicillin in blood cells of *Cyprinus carpio***

José Manuel Orozco-Hernández¹, Leobardo Manuel Gómez Oliván^{1*}, Gerardo Heredia-García¹, Marlenee Luja-Mondragón¹, Hariz Islas-Flores¹, Nely SanJuan-Reyes², Marcela Galar-Martínez², Sandra García-Medina², Octavio Dublán-García¹

¹ Laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Colonia Universidad. CP 50120 Toluca, Estado de México. MEXICO.

² Laboratorio de Toxicología Acuática del Departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Adolfo López Mateos. Avenida Wilfrido Massieu y Manuel Stampa. Colonia Industrial Vallejo. CDMX. CP 07700. MEXICO

*Corresponding author:

Dr. Leobardo Manuel Gómez-Oliván

¹ Laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Colonia Universidad. CP 50120 Toluca, Estado de México. MEXICO.. Telephone +(52) 7222173890; fax +(52) 7222173890. E-mail: imgomezo@uaemex.mx; lgolivan74@gmail.com

Abstract

Amoxicillin (AMX) is a pharmaceutical widely employed in human and veterinary medicine worldwide. Its wide production and use has led to this pharmaceutical being released into the environment in concentrations that range from ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$. Previous studies have demonstrated that this antibiotic generates toxic effects, amongst which alterations to embryonic development and oxidative stress in aquatic organisms, is noteworthy. Nonetheless, it is necessary to characterize the risks that this pharmaceutical represents for species of economic interest such as *Cyprinus carpio*, in a more precise manner. The aim of this work was to demonstrate if AMX, at environmentally-relevant concentrations, is capable of inducing genotoxic and cytotoxic alterations in *C. carpio*. In order to evaluate genotoxicity, the comet assay and frequency of micronuclei were the methods used; in order to determine cytotoxic effects, the activity of caspase-3 and the TUNEL assay were carried out. The results showed that the effects of the biomarkers had their maximum at 72 h; in the case of the comet assay, $0.039 \mu\text{g L}^{-1}$ corresponds to 29% and $1.67 \mu\text{g L}^{-1}$ corresponds to 40%; for the frequency of micronuclei, there was 205% for C1 and 311% for C2; for caspase-3 activity, 262% was obtained for C1 and 787% for C2; for the TUNEL assay, 86% and 120% were obtained for C1 and C2, respectively. The results showed that environmentally-relevant concentrations, AMX was capable of generating DNA alterations and cytotoxic effects in blood cells of the common carp.

Key words: AMX, genotoxicity, cytotoxicity, common carp, environmentally-relevant concentrations.

1. Introduction

Among the pharmaceutical products of greatest consumption, antibiotics are found, which are used in large quantities worldwide in human medicine as well as veterinary medicine for the treatment of microbial infections and to improve the growth and feeding efficiency of the cattle. In consequence, relatively high concentrations of antibiotics can be found in diverse bodies of water (Manzetti and Ghisi, 2014; Zheng et al., 2012).

Previous studies have reported that the most-used antibiotics are those found in the beta-lactam group, which can be divided into penicillin, cephalosporins, monobactams and carbapenems (Hooper, 2001). These antibiotics are of natural origin or semisynthetic and are characterized by possessing a beta-lactam ring in its structure. They act inhibiting the last stage of the synthesis of the bacterial cell wall, they have a slow bactericidal action, are relatively independent of plasma concentration, present little toxicity in humans and possess a wide therapeutic margin (Hooper, 2001). Within this group, amoxicillin (AMX) can be found, which is prescribed to treat bronchitis, infections (ear, skin, throat and urinary tract), as well as inflammation of the amygdalae. In aquaculture, AMX incorporates itself into granulated foods or is applied directly to water for the treatment of streptococcosis, furunculosis, and pasteurelosis (Lalumera et al., 2004).

The wide medical and veterinary use of AMX contributes to its elimination through different water bodies, via municipal, hospital and industrial waste discharge. This can be demonstrated in different reports in which there is literature available concerning its occurrence (Fatta-Kassinos et al., 2011; Watkinson et al., 2007).

For example, Kasprzyk-Hordern et al. (2007) reported that in hospital and urban effluents, concentrations of this pharmaceutical were of 0.9 and 1.67 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively; in surface waters, concentrations between 0.039 and 0.0245 $\mu\text{g L}^{-1}$, were found. Likewise, diverse reports have exhibited the AMX occurrence in diverse water bodies worldwide: in Hong Kong, concentrations from 0.64 to 76 ng L^{-1} in waste water treatment plant effluents have been found (Van et al., 2016); in Palermo, Italy, Zuccato et al. (2010) reported concentrations from 1.80-4.60 ng L^{-1} in waste water treatment plant effluents; In Mallorca Island, Spain, concentrations between 39-283 ng L^{-1} (Rodriguez-Mozaz et al., 2015) were determined. Also, AMX has been correlated with diverse toxicological effects in aquatic organisms. Among the studies reported, we can mention Oliveira et al., (2013), who demonstrated that short exposure times, in concentrations of AMX ranging from 10 to 900 mg L^{-1} , induce premature hatching, as well as malformations such as edema, tail deformations in embryos and alterations of the enzymatic activity in embryos and adults of *Danio rerio*. Liu et al., (2015) reported that AMX generated oxidative stress in the photosynthetic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, increasing the levels of malondialdehyde and the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and glutathione S transferase (GST), as well the content of glutathione (GSH). In contrast, Matozzo et al. (2016) demonstrated that AMX at concentrations of 100, 200 and 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ diminished the activity of SOD and catalase (CAT) in *Ruditapes philippinarum* and *Mytilus galloprovincialis*. In 2017, an investigation carried out by our group demonstrated that AMX at concentrations of 10 ng L^{-1} , 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 10 mg L^{-1} generated an increase in the levels of lipoperoxidation (LPX), hydroperoxide content (HPC) and carbonylated protein content (PCC), as well as SOD, CAT and glutathione peroxidase (GPx) in brain, kidney and gills of *Cyprinus carpio* (Elizalde-Velázquez et al., 2017).

The generation of oxidative stress induced by AMX, demonstrated by some authors, can alter the integrity of biomolecules such as lipids, proteins and DNA, as well as being associated with organic illnesses which could affect fertility, health and the lifecycle of fish, as has been demonstrated by Theodorakis et al. (2000), and also provoking genotoxicity and cytotoxicity. The genotoxicity can be evaluated through the use of different biomarkers such as unicellular electrophoresis in gel (comet assay), which proved to be a useful test in environmental monitoring and genetic ecotoxicology (Bolognesi and Cirillo, 2014), and the micronuclei assay (MN), which has been indicated as one of the most-employed methods for the measurement of chromosomic structural and numeric changes in different systems *in vitro* e *in vivo* (Bolognesi and Hayashi, 2011). Cytotoxicity can be determined through different biomarkers; however, caspase-3 activity and the TUNEL assay (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) have shown to be very efficient in the evaluation of cytotoxicity in aquatic organisms (Alak et al., 2019; Formigari et al., 2007; Sun et al., 2019; Wang et al., 2019). Due to the aforementioned, the aim of this study was to evaluate the genotoxic and cytotoxic alterations induced by environmentally-relevant concentrations of AMX in bloods cells of the common carp *C. carpio*.

2. Materials and methods

Unless otherwise indicated, all the reagents employed in the experiments were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

2.1 Test substances

Trihydrated amoxicillin (CAS number 61336-70-7, >98.0% purity) $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$, 365.40 Da, was purchased from Tokyo Chemical Industry Co., LTD.

2.2 Test organisms and their maintenance

In order to carry out the genotoxicity and cytotoxicity tests, *C. carpio* (common carp) was used as a test organism or subject. The organisms were acquired in one of the most important carp-breeding centers of the country (Tiacaque, State of Mexico), where it was guaranteed that the organisms were in good health conditions, as well as not exposed to any substance that could alter its health. Posteriorly, the organisms were transported to the Environmental Toxicology Lab. in polyethylene bags previously provisioned of water and oxygen. In the laboratory, the carps were placed in tanks with a capacity of 160 L for 15 days, at room temperature with normal periods of light and darkness, with continuous aeration, pH of 7.4 and fed daily with Pedregal Silver™ for fish.

2.3 Experimental design for the genotoxicity and cytotoxicity studies

For the experiment, organisms of 11.39 ± 0.31 cm size and a weight of 25.71 ± 2.8 g, were used, and these were maintained in similar conditions during the acclimatization period. The toxicity assays consisted in the incorporation of AMX at concentrations of $0.039 \mu\text{g L}^{-1}$ and $1.67 \mu\text{g L}^{-1}$ (Kasprzyk-Hordern et al., 2007). These were selected due to the fact that they were environmentally relevant, identified in urban effluent and surface waters. For the cytotoxicity and genotoxicity tests, 15 test systems with 5 organisms in each of them, were employed: 1) five for concentration 1 ($0.039 \mu\text{g L}^{-1}$), 2) five for concentration 2 ($1.67 \mu\text{g L}^{-1}$) and 3) five corresponding to the control group (AMX free). Exposure times employed were 12, 24, 48, 72 and 96 h. The study was carried out in triplicate. In total, 225 test organisms were used. Once each exposure time had finalized, the organisms were removed from the systems and were placed in a tank that contained xylocaine solution (0.02 mg mL^{-1}), with the finality of anesthetizing the organisms and obtaining blood samples from the

caudal vein with a 1-mL hypodermic syringe, previously heparinized. With the blood samples, the genotoxicity and cytotoxicity studies were carried out, employing the methods described as follows:

2.4 Evaluation of genotoxic effects

The genotoxic alterations induced by AMX in blood cells of *C. carpio* were evaluated through two biomarkers: 1) unicellular electrophoresis (comet assay) and 2) micronuclei test.

2.4.1 Unicellular electrophoresis (comet assay)

Genetic damage evaluation by unicellular gel test (*comet assay*) was carried out in five consecutive steps: 1) suspension of lymphocytes in agarose, 2) release of DNA in lysis solution, 3) unicellular electrophoresis, 4) neutralization, and 5) unicellular stain with ethidium bromide. For this purpose, the methodology established by Tice et al. (2000) was used. One day before the test, slides were prepared by placing a 100 μ L layer of 1% high melting point agarose. The next day, 10 μ L of the lymphocyte suspension was mixed with 75 μ L (0.75%) low melting point agarose, and then 75 μ L of this mixture were placed on previously prepared slides. For the DNA release, the slides were placed for 1 h at 4 ° C in a coplin glass with the lysis solution (2.5 M sodium chloride, 10 mM Trizma, 10% DMSO, 1% triton and pH 10). The slides were then placed in the electrophoresis chamber under the following conditions: time 20 min, 900 mL cold alkaline solution at 4 ° C (300 mM sodium hydroxide and 1 mM EDTA) at pH 13, 300 mA, 25 V and pH > 13. The process was stopped with a neutralization buffer (0.4 M of Trizma base) at a pH 7.4

Finally, the slides were dried for 6 h, stained with 50 μ L of ethidium bromide and examined under the fluorescence microscope (Zeiss) with the program Image-pro plus 5.0 (Media Cybernetics) and a wave filter of 450-490 nm. 100 measurements were made per treatment

and the damage was obtained by means of the DI, which is the ratio of the length of the tail of the comet and the nuclear diameter.

2.4.2 Micronuclei test

1000 blood cells were analyzed and the content of micronuclei was determined by the method of Çavaş and Ergene-Gözükara (2005). A drop of blood from the carps (exposed to the different concentrations of environmentally relevant AMX) was placed on a slide; a smear was performed and this was stained with 10% Giemsa stain for 9 min. Micronuclei were observed as DNA fragments in the erythrocytes under an optical microscope.

2.5 Evaluation of cytotoxic effects

The cytotoxic effects induced by AMX in blood cells of *C. carpio* were determined through 1) caspase-3 activity and 2) TUNEL assay.

2.5.1 Caspase-3 activity

2.5.1.1 Cell extract

Cell extracts

Positive control consisted of Jurkat cells (ATCC # TIB-152), density of 10^6 cells mL^{-1} and 50 ng mL^{-1} of anti-Fas mAb (clone # CH-11, MBL International, Cat. # SY-001). For the negative control (inhibited apoptosis samples), the same cells and 125 μL of Z-VAD-FMK [carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-(O-methyl) fluoromethylketone] (20 mM) were added. Both solutions were incubated in darkness for 16 h at 37 ° C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . Cell extracts were obtained by centrifugation at 450 x g at 4 ° C for 10 min. Pellet was washed with PBS at 4 ° C and resuspended in cell lysis buffer at a concentration of 10^8 cells mL^{-1} . The cells were lysed by freezing-thawing, and incubated on ice for 15 minutes. The cell lysates were centrifuged at 15,000 x g at 4 ° C for 20 min, finally the supernatant was the cell extract used in the test.

2.5.1.2 Colorimetric assay

The indications established in the kit were followed (CaspACETM, Promega, Madison, WI). In microplates with flat bottom were prepared the following systems:

- 1) Reaction blank: 32 μL of the caspase buffer [HEPES 312.5 mM, pH 7.5; sucrose 31.25%; CHAPS 0.3125% (3 - [(3-Colamidopropyl) -dimethylammonium] -propane sulfonate)]; 2 μL DMSO; 10 μL dithiothreitol (DTT, 100 mM) and 54 μL of deionized water;
- 2) Exposed group: 32 μL of caspase buffer; 2 μL of DMSO; 10 μL of DTT, 20 μL of blood and 54 μL of deionized water ;
- 3) Positive and negative control: 32 μL of the caspase buffer; 2 μL of DMSO; 10 μL of DTT; 20 μL of the cell extract (for each case) and 34 μL of deionized water.

To each system, 2 μL of the substrate DEVD-pNA was added. The microplates were covered with parafilm and incubated at 37 ° C for 4 h. Finally, the absorbance at 405 nm was read and the specific activity of caspase-3 calculated. The results were expressed as nM of free pNA h⁻¹ μg protein⁻¹.

2.5.2 TUNEL assay

The ApopTag Fluorescein S7110 kit (Chemicon, Temecula CA) was used to identify apoptotic cells. The kit consists of 6 sequential stages that consisted of: 1) obtaining lymphocytes, 2) cell preservation, 3) cellular fixation, 4) hydration, 5) cell labeling and 6) cell staining. For the first stage, a sample of 300 μL of blood plasma (from carps exposed to environmentally relevant concentrations of AMX) was placed in an eppendorf tube and centrifuged at 3000 g x for 5 min at 4 ° C to obtain lymphocytes. These cells were resuspended with 50 μL of mounting solution. A 1 μL of this solution was placed on a slide previously prepared with poly-L-lysine and dried for 5 min at 60 ° C. Once the cellular

material was dried, it was fixed with cold acetone for 10 min (stage 2). For the third stage, the slides were placed in serial solutions of xylene-absolute alcohol, at 96, 80, 70, 60, 50% (v/v) and finally 30s in distilled water. Hydrated cells were added with 1 μL of proteinase k ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 10 minutes. Three washes were made with PBS (0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl) pH 7.4 for 1 min and 60 μL of the equilibrium buffer was added, followed by an incubation at 37 ° C for 1 h, previously adding 65 μL of the TdT enzyme (Stage 4). For cell labeling (Stage 5) a wash with PBS was performed and the anti-FITC conjugate was added at room temperature for 30 min. Finally, for cell staining (step 6), propidium iodide ($1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) was used as a dye and examined in an epifluorescence microscope with a digital camera.

The negative control consisted of cells treated as described above, but without the addition of TdT, and the positive control consisted of cells treated with DNase I ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). A total of 100 cells were analyzed per fish and apoptosis was expressed as the percentage of TUNEL positive cells in 100 cells.

2.6 Determination of the concentration of total proteins

Plasma proteins were determined in order to normalize the genotoxicity and cytotoxicity biomarkers evaluated in carps exposed to AMX. For this, 50 μL of plasma and 150 μL of deionized water were placed in a test tube, then 5 mL of Bradford reagent (0.10 g of Coomassie blue, 50 mL of 96% ethanol and 100 mL of H_3PO_4 , in one liter of deionized water). The tube content was homogenized and allowed to rest for 5 min. The absorbance was subsequently read at 595 nm. The data were extrapolated in a standard bovine serum albumin curve. The method used for this determination was Bradford (1976).

2.7 Determination of the concentration of AMX in the blood of *Cyprinus carpio*

For the determination of AMX in carp blood, the same systems utilized to determine the biomarkers of genotoxicity and cytotoxicity indicated in section 2.3 were employed. From the systems, 5-mL samples of water were taken, to carry out the determination of AMX in water at the different exposure times. For the blood samples, a part was employed in order to carry out the cytotoxicity and genotoxicity studies and the other, in order to carry out the determination of AMX in the blood of *C. carpio*.

For the determination of AMX in water and plasma, a standard solution of AMX (50 µg/L), using sodium hydroxide in methanol (40 mM) in 50% acetonitrile, was prepared. Different dilutions were prepared from a stock solution in order to carry out the calibration curve and these solutions were stored at 4 °C.

For the determination of AMX in plasma of *C. carpio* and in water of the exposure systems, a Shimadzu Prominence LC equipment connected to a AB SCIEX API 3200 LC-MS/MS system equipped with a Turbo V source and a ionization probe by electropulverization (ESI). The chromatographic conditions utilized were the following: the column used was a C18 Synergi (50 nm x 2 mm; 2.5 µm of particle diameter).

The mobile phase was 0.2% formic acid, 0.1 mM oxalic acid in water at 100% (A) and 2% formic acid, 0.1 mM oxalic acid in acetonitrile at 100% (B). The conditions of the gradient were used in the following manner: first, it increased from 0% to 75% of B at 1 min; second, it was kept at 75% of B at 1.6 min and then again at 0% of B at 4.6 min. The injection time was 7.2 min. The chromatographic parameters employed were the following: flow rate of 0.3 mL min⁻¹ and injection volume of 20 µL. The MS/MS conditions were TSI ionization, ion spray voltage (IS) of positive 35 V, nebulizer (ion source gas 1) of 40 psi, dry-gas (ion source gas 2) of 60 psi, dry-gas temperature of 400 °C, collision gas (CAD) of

5 psi, curtain-gas flow (CUR) of 30 psi and scan type being positive multiple-reaction mode (+MRM). The limits of detection and quantification were: LOD=0.11g ng/L and LOQ = 0.325 ng/L.

2.8 Correlation between the plasma concentrations of AMX in *C. carpio* and the biomarkers of genotoxicity and cytotoxicity

A plasma correlation was carried out between both concentrations of AMX: C1 (0.039 $\mu\text{g L}^{-1}$) and C2 (1.67 $\mu\text{g L}^{-1}$) and the biomarkers of genotoxicity (comet assay and the presence of MN) and of cytotoxicity (caspase-3 activity and the TUNEL test). Correlation was carried out via a Pearson analysis, employing the Sigmastat v2.03 program.

2.8 Statistical analysis

The normality of the data and homoscedasticity were verified via the Shapiro-Wilk and Levene methods, respectively. The *Bonferroni post hoc* test was applied to evaluate significant differences, with $p < 0.05$. In order to carry out the analysis, the Sigmastat program v2.03 was used.

3. Results

3.1 Unicellular electrophoresis (*Comet assay*)

In figure 1, a tendency was observed in the increase of DNA damage in comparison with the control group in the majority of the exposure times for both concentrations. At the amoxicillin concentration of 0.039 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C1), a significant increase was identified for exposure times 12, 24, 48, 72 and 96 h with a percentage of 16%, 20%, 22%, 29% and 14%, respectively, with regard to the control group ($p < 0.05$). For the concentration (C2) of 1.67 $\mu\text{g L}^{-1}$ at the times of 12, 24, 48, 72 and 96 h, significant increases of 25%, 31%, 33%, 40% and 20% were observed with regard to the control group ($p < 0.05$), respectively.

For C1, statistically-significant increases at the exposure times of 12 and 24 with regard to 72 h, with percentages of 13% and 9%, respectively, were observed. For the same concentration at 96 h, a statistically-significant decrease of 15% with regard to 72 h ($p < 0.05$) was seen. For C2, a significant increase of 15% at 12 h with regard to 72 h and a significant decrease of 20% at 72 h with regard to 96 h, was found ($p < 0.05$).

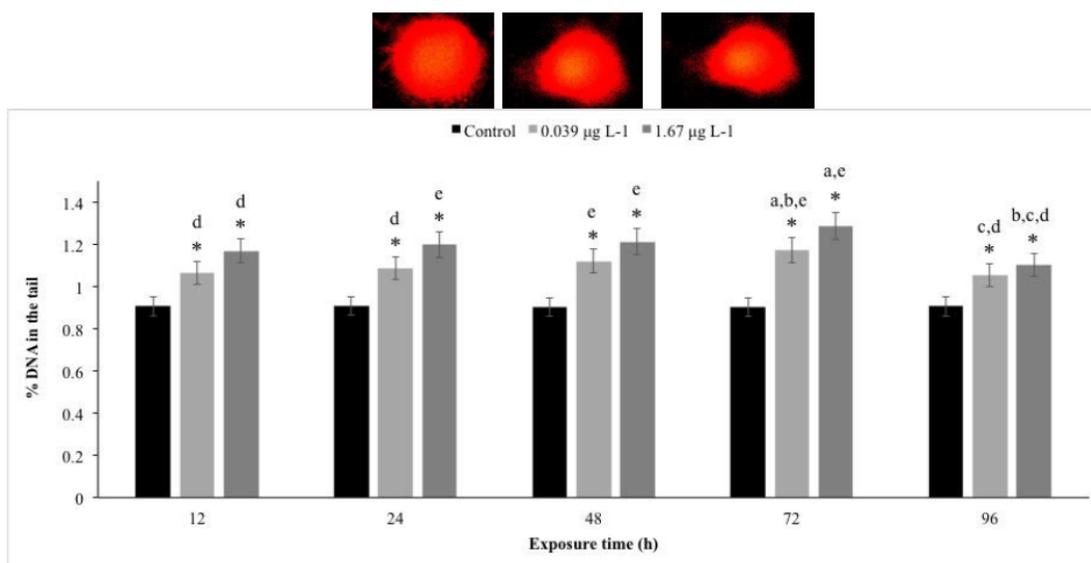


Figure 1. Determination of the DNA damage via the comet assay in blood cells of *Cyprinus carpio* exposed to AMX. The bars represent the mean \pm SEM of the index values of damage of five specimens by concentration and by exposure time. The assay was carried out in triplicate. Significantly different from *control group; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

3.2 Micronuclei test

In figure 2, a tendency in increase is observed in the MN test in comparison with the control group in the majority of the exposure times for both concentrations. At the amoxicillin concentration of 0.039 µg/L (C1), a significant increase was observed for

exposure times 12, 24, 48, 72 and 96 h with percentages of 100, 200, 150, 205 and 136%, respectively ($p < 0.05$).

For the concentration of 1.67 $\mu\text{g/L}$ (C2) at times 12, 24, 48, 72 and 96 h, there was a significant increase of 60%, 122%, 133%, 311% and 261%, respectively, with regard to the control group ($p < 0.05$).

Comparing exposure times for C1, a significant increase was observed at 12 hours with regard to 24, 48, 72 and 96 h with 100, 50, 105 and 36%, respectively. In the case of C2 (1.67 $\mu\text{g/L}$), at 72 h, a statistically-significant decrease at 12, 24, 48 and 96 h of 151, 189, 178 and 50%, was observed ($p < 0.05$).

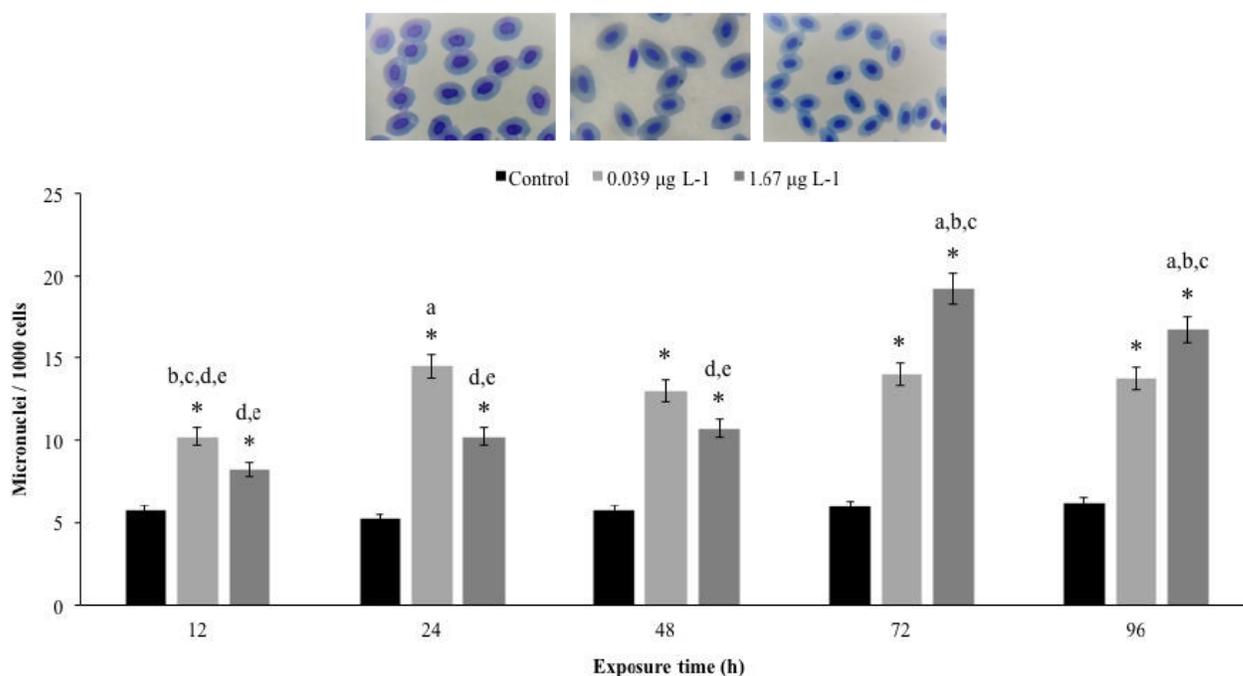


Figure 2. Frequency of micronuclei in blood of *Cyprinus carpio* exposed to AMX at 12, 24, 48, 72 and 96 h. The values are the mean of three repetitions \pm SEM. Significantly different from: *control group; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

3.3 Caspase-3 activity

In figure 3, alterations were identified in the activity of caspase-3 with regard to the control group at the majority of the exposure times for both concentrations. A significant increase with regard to the positive control for the exposure times of 72 and 96 h was observed, with the percentages of 45% and 59%, respectively in C1 and in a significant decrease of 62% at 12 hours ($p < 0.05$). For C2, a significant increase took place in enzymatic activity of 9%, 59% 110%, 255% and 172%, at 12, 24, 48, 72 and 96 h with regard to the positive control ($p < 0.05$). Comparing the controls with both concentrations, it is observed that for C1, there were significant increases of 58%, 109%, 262% and 250% for 24, 48, 72 and 96 h. In C2, at 12, 24, 48, 72 and 96 h, increments of 155%, 150%, 281%, 787% and 500%, respectively, were observed.

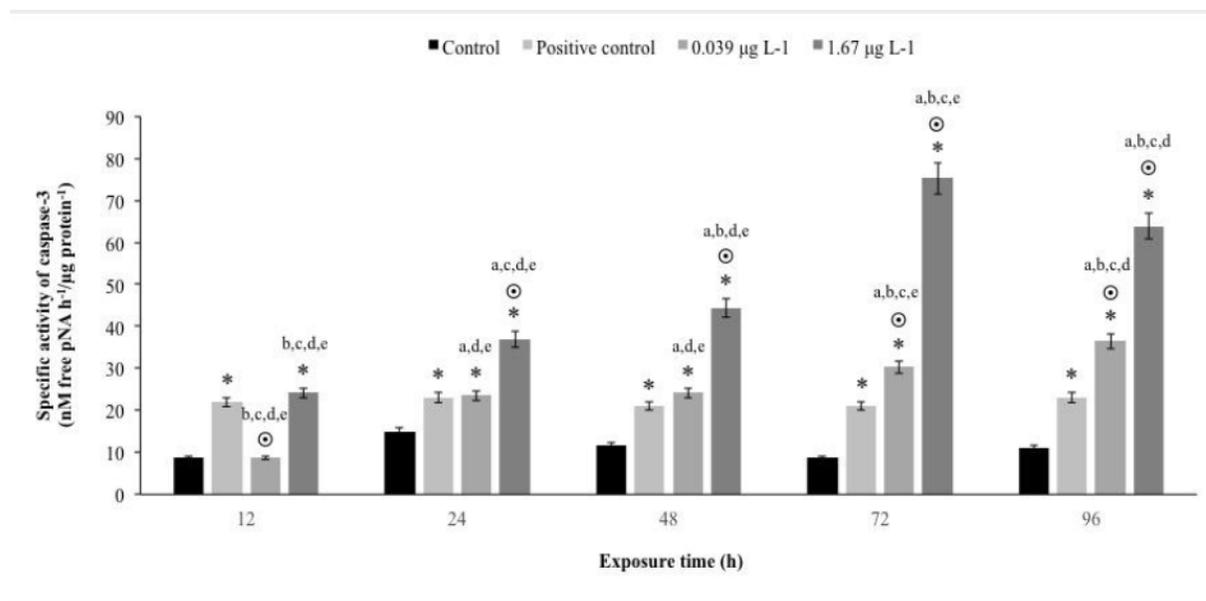


Figure 3. Caspase-3 activity in blood of *Cyprinus carpio* exposed to AMX for 12, 24, 48, 72 and 96 h. The values are the mean of three repetitions \pm SEM. Significantly different from: *control group; [⊙] Positive control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

3.4 TUNEL assay

In figure 4, the percentage of TUNEL-positive cells presenting a significant increase with regard to the control group at all the exposure times for both concentrations. For C1, statistically-significant increases of 28%, 64%, 66%, 86% and 66% with regard to the control group at 12, 24, 48, 72 and 96 h, respectively, were observed. In the same manner, for the same exposure times, increases of 57%, 78%, 86%, 120% and 93%, respectively, were observed for C2 with regard to the control.

Comparing both concentrations with regard to the positive control, significant decreases ($p < 0.05$) of 75%, 70%, 65%, 64% and 65% were observed for C1 and 69%, 66%, 61%, 57% and 60% for C2, with regard to the positive control at 12, 24, 48, 72 and 96 h, respectively ($p < 0.05$).

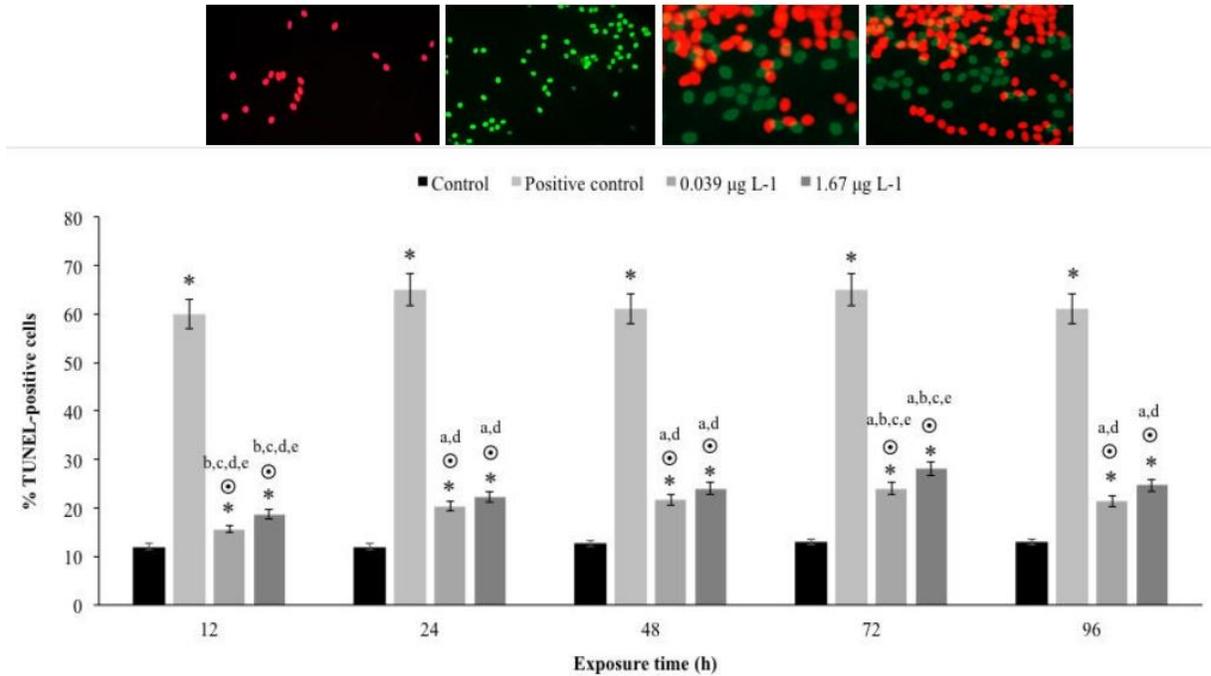


Figure 4. Determination via TUNEL assay, of the percentage of apoptotic cells in blood of *Cyprinus carpio* exposed to AMX for 12, 24, 48, 72 and 96 h. The values are the mean of three repetitions \pm SEM. Significantly different from: * control group; \odot Positive control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

3.5 Determination of the concentration of AMX in water and blood of *Cyprinus carpio*

In table 1, the concentration data of AMX present in the water of the exposure systems and in plasma of *C. carpio* at the different exposure times employed, are indicated. As can be seen in water after increasing exposure times, a gradual decrease in the concentration of AMX in water and an increase in plasma was observed.

Table 1. Kinetics of the concentration of AMX in water in the system and plasma of the common carp *C.*

carpio

Exposure concentration	Exposure time	AMX in water system ng L ⁻¹	AMX in blood carp <i>Cyprinus carpio</i> ng L ⁻¹
------------------------	---------------	---	---

Control group	12	ND	ND
	24	ND	ND
	48	ND	ND
	72	ND	ND
	96	ND	Nd
C1 0.039 $\mu\text{g L}^{-1}$	12	28.1 \pm 1.5	8.3 \pm 0.8
	24	22.2 \pm 1.3	14.1 \pm 1.1
	48	17.1 \pm 1.8	19.3 \pm 0.9
	72	14.3 \pm 1.5	22.6 \pm 1.2
	96	12.2 \pm 1.8	25.1 \pm 1.1
C2 1.67 $\mu\text{g L}^{-1}$	12	1245.3 \pm 2.6	321.3 \pm 2.3
	24	1023 \pm 4.1	492.7 \pm 3.6
	48	987 \pm 5.2	581.6 \pm 4.5
	72	715 \pm 7.3	832 \pm 7.3
	96	523 \pm 6.4	992 \pm 6.2

3.6 Correlation of biomarkers of genotoxicity and cytotoxicity with plasma levels of AMX in common carp *C. carpio*

In table 2, the correlation data between the plasma levels of *C. carpio* and the biomarkers of cyto-genotoxicity observed at different exposure times, are shown. As can be observed, there is a major correlation between the plasma levels of AMX in carp and the biomarkers evaluated in C1: DNA damage, presence of micronuclei and caspase-3 activity were the most relevant; in C2, presence of micronuclei and the presence of apoptosis, evidenced through the TUNEL assay, were those that correlated best.

Table 2. Pearson's correlation between AMX concentrations and biomarkers of geno- and cytotoxicity in blood of *C. carpio*. Correlation coefficients >0.5 are significant (shown in bold).

Biomarkers	Time (h)	AMX	
		0.039 $\mu\text{g L}^{-1}$	1.67 $\mu\text{g L}^{-1}$
Comet assay	12	-0.944	0.769
	24	-0.900	-0.990
	48	0.969	-0.035
	72	-0.472	-0.064
	96	-0.490	0.911
Micronucleus test	12	-0.240	-0.654
	24	0.240	-0.500
	48	1.000	-0.740
	72	0.970	0.740
	96	-1.000	-0.981
Caspase-3 activity	12	0.895	0.417
	24	-0.500	0.938
	48	0.500	-0.176
	72	1.000	-0.424
	96	1.000	-0.038
TUNEL assay	12	0.993	0.327
	24	0.327	0.397
	48	0.654	0.500
	72	-0.500	0.500
	96	-0.327	0.327

4. Discussion

This work was carried out due to the fact that, in a previous study carried out by our research team, we demonstrated that AMX was capable of generating the induction of oxidative stress at concentrations of 10 ng L^{-1} , 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 10 mg L^{-1} in brain, gills, liver and kidney of *C. carpio* (Elizalde-Velázquez et al., 2017). Since oxidative stress has been

linked to genotoxic and cytotoxic effects in fish (Anlas and Ustuner, 2016; García-Medina et al., 2013; Oliveira et al., 2013), we desired to determine if AMX, at environmentally-relevant concentrations, reported in literature worldwide, was capable of inducing cytotoxic and genotoxic alterations in the blood cells of *C. carpio*.

There are some studies that have demonstrated the capacity of AMX of generating DNA alterations, genotoxicity and cytotoxicity in mammals (Arabski et al., 2005; Fahmy et al., 2017; İstifli and Topaktaş, 2009; Li et al., 2007); however, some of the authors have demonstrated that the damage to DNA could start at 10 min (Li et al., 2007), but that at 60 minutes or a few hours later, the reparation processes diminishes the damage. With regard to the genotoxic effects induced by AMX in aquatic organisms, few are the studies which have associated the presence of AMX with damage or alterations to DNA and have been carried out employing very high concentrations of AMX, which are not environmentally relevant. Anlas and Ustuner (2016) demonstrated that at concentrations of 320 mg Kg⁻¹, AMX was capable of generating an increase in the frequency of micronuclei and damage to DNA, employing the comet assay in *Oncorhynchus mykiss*. These authors attribute the effect to oxidative stress and suggest that the increase in reactive oxygen species (ROS) could result in the phenomenon of apoptosis. On the other hand, Oliveira et al. (2013) demonstrated that AMX, at concentrations of 75, 128 y 221 mg L⁻¹, induced oxidative stress and alterations in the hatching rate of embryos and the adults of zebrafish.

These detail that in adults, there was a significant decrease in catalase activity and an induction of the glutathione S transferase enzyme.

As can be seen in the results obtained in this study, AMX at concentrations of 0.039 µg L⁻¹ and 1.67 µg L⁻¹ was capable of inducing DNA damage, demonstrated via the comet assay and micronuclei test. With the first biomarker, statistically-significant increases of up to

30% in C1 and 40% in C2 were observed; with the micronuclei test, increases of up to 205% for C1 and 311% for C2 were observed. These results are consistent with those obtained by Anlas and Ustuner (2016); the difference in this study is that much lower and thus environmentally-relevant concentrations were employed. Results obtained with both biomarkers could be attributed to the phenomenon of oxidative stress. As we mentioned at the beginning of this section, in the previous study carried out by our research team, we demonstrated that AMX was capable of inducing oxidative stress at low concentrations (10 ng L⁻¹ and 10 µg L⁻¹). The reactive oxygen species were capable of generating modifications over purine and pyrimidine DNA bases, on species such as 8-oxoguanine (8-oxoG), thymine glycol and 5-hydroxy-methyluracile.

The damage to 8-oxoG and no adequate reparation generates simple or double ruptures and mutations in the GC-TA bases, which could lead to genomic instability (Grollman and Moriya, 1993).

As has been previously demonstrated, AMX could induce oxidative stress in diverse species of fish as *C. carpio* and *Danio rerio* (Elizalde-Velázquez et al., 2017; Oliveira et al., 2013); there is a great probability that 8-oxoG is accumulated in the telomers by the elevated incidence of guanine residues in the telomeric DNA sequences (Coluzzi et al., 2014). Likewise, the telomers are repaired with less efficiency than the rest of the genome. Also, 8-oxoG inhibits the activity of telomerase and diminishes the union of the telomeric proteins to the sequence of the telomers, which leads to the interruption of the longitude, the maintenance and the function of the telomers (Coluzzi et al., 2014; Houben et al., 2008; von Zglinicki et al., 2000). It is well-known that oxidative stress induces ruptures in only one strand in telomeric DNA. The findings mentioned above could explain our results obtained in the comet assay. On another hand, the frequency of micronuclei was

considerably increased in the present work; the elevation of the biomarker could be due to the rupture of DNA or the lack of the segregation of the chromosomes, the resulting events of the aneugenic and clastogenic effects provoked by ROS (Canistro et al., 2012; SanJuan-Reyes et al., 2015).

In their studies, Anlas and Ustuner (2016) mention that the increment of micronuclei and DNA damage could be provoked by the production of ROS and lead to cell apoptosis; however, this hypothesis is not proven by those authors. In our results, this finding could be proven using two biomarkers. 1) the activity of caspase-3 and the TUNEL assay. Apoptosis is programmed cell death and serves the cells as a mechanism in order to maintain homeostasis; The start of this process could be the event that generates cytotoxicity and diverse illnesses (Köhler et al., 2002). There are studies that demonstrate that elevated concentrations of ROS, as well as H₂O₂ and the superoxide radical anion, could lead to the oxidation of the caspase-3 or could also generate a failure over the production of energy on behalf of the mitochondria, which results in cell damage (Asada et al., 2001; Espe et al., 2015; Yuan et al., 2003).

The mitochondria carry out a fundamental paper in the activation of apoptosis induced by multiple stimuli, including the chemical, as in the presence of AMX. It is well-known that mitochondria are a target of ROS (Makpol et al., 2012).

Caspase-3 is an effector in both routes of apoptosis (intrinsic and extrinsic) (Reyes-Becerril et al., 2018). The increase in this biomarker found in *C. carpio* could also be explained by the fact that the reactive oxygen species induced by the exposition to AMX induce a change in membrane potential with the consequent decrease in the production of ATP and an increase in the levels of calcium (Yamamoto et al., 2002; Zhou et al., 2019). The alterations

to DNA and an increase of cytosolic calcium initiate the intrinsic route. In this route, cytochrome c and other apoptogenic proteins in the cytosol are released through the aperture of the mitochondrial pores regulated by the Bcl-2 family; all these phenomena are caused by the presence of ROS. Free cytochrome c binds to Apaf1 (activation factor of apoptotic protease 1) forming a multimeric complex which recruits and activates procaspase-9 (Gómez-Oliván et al., 2017; Verleih et al., 2019). Activated caspase-9 promotes the activation of the procaspase-3 effector. Caspase-3 is responsible for the proteolytic cleavage of a wide range of cell targets and leads to cell death (Jin et al., 2019); the increase in the activity of caspase is observed in the apoptotic processes. The apoptosis observed by exposure to AMX in *C. carpio* was confirmed by the TUNEL assay; the results obtained demonstrated a significant increase in positive apoptotic cells. The TUNEL assay is a very efficient biomarker, which is currently employed to detect DNA damage *in situ*; this method has the capacity of identifying in the cell, the initial stages of the apoptotic process, besides those in which morphological changes have been generated, which are apoptotic bodies (Chen et al., 2018; Quan et al., 2019). In this case, cells treated with DNase I were used as a positive control; DNase is an endonuclease which has the capacity of inducing DNA fragmentation (Fahmi et al., 2017; Zhdanov et al., 2015), for which, when compared to the control group, statistically-significant increases were observed; however, when the positive control was compared to C1 and C2, significant decreases between 57-75% were observed, but both concentrations showed statistically-significant increases compared to the control group, evidenced by positive apoptotic cells. Results obtained in this biomarker could be explained by the alterations of DNA produced by ROS, induced by AMX in *C. carpio* and also confirm the apoptosis identified with the rise in caspase-3 activity.

Results obtained with the biomarkers as an increase in the activity of caspase-3 and the positive apoptotic cells induced by AMX in the blood of common carp confirm the cytotoxic effects of this antibiotic.

Pearson correlation between the concentrations of AMX in plasma of *C. carpio* and the biomarkers of geno- and cytotoxicity evaluated showed that in both concentrations, there is a relationship between the plasma levels of the antibiotic and damage to DNA, and the apoptosis presented in blood cells. The maximum responses of the biomarkers of genotoxicity and cytotoxicity are observed at 72 h, and after 96 h, decreases in biomarkers were observed. This evidences that the reparation mechanisms in fish are much more inefficient than those presented in mammals. However, more measurements of the responses evaluated in longer exposure times are required.

5. Conclusions

AMX in environmentally-relevant concentrations, 0.039 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 1.67 $\mu\text{g L}^{-1}$, was capable of generating genotoxic alterations and cytotoxic effects in blood cells of common carp *C. carpio*. AMX, released in a constant manner to the water bodies, represents a risk for the species of fish of economic interest such as *C. carpio*. The biomarkers employed could be of utility in order to demonstrate the effects of AMX in aquatic species.

Acknowledgements

This study was possible thanks to the financial support of Department of Investigation and Advanced Studies of the Autonomous University of Mexico (Project 4735/2019CIB).

Our acknowledgement to biologist Gerardo Ontiveros of the Tiacaque carp-breeding center, for providing test specimens and counsel concerning the keeping of the fish.

References

- Alak, G., Yeltekin, A.Ç., Uçar, A., Parlak, V., Türkez, H., Atamanalp, M., 2019. Borax Alleviates Copper-Induced Renal Injury via Inhibiting the DNA Damage and Apoptosis in Rainbow Trout. *Biol. Trace Elem. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1622-5>
- Anlas, C., Ustuner, O., 2016. Genotoxic assessment of amoxicillin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by comet assay and micronucleus test. *Fresen. Environ. Bull.* 25(12),5358-5364.
- Arabski, M., Kazmierczak, P., Wisniewska-Jarosinska, M., Poplawski, T., Klupinska, G., Chojnacki, J., Drzewoski, J., Blasiak, J., 2005. Interaction of amoxicillin with DNA in human lymphocytes and *H. pylori*infected and non-infected gastric mucosa cells. *Chem. Biol. Interact.* 152, 13–24. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2005.01.004>
- Asada, S., Fukuda, K., Nishisaka, F., Matsukawa, M., Hamanisi, C., 2001. Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm. Res.* 50, 19–23. <https://doi.org/10.1007/s000110050719>
- Bolognesi, C., Cirillo, S., 2014. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Curr. Zool.* 60(2): 273-284.
- Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205–213. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Canistro, D., Melega, S., Ranieri, D., Sapone, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Rizzoni,

- M., Paolini, M., 2012. Modulation of cytochrome P450 and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed in situ to surface water treated with chlorine or alternative disinfectants in different seasons. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 729, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.09.008>
- Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.05.007>
- Chen, H., Wang, P., Du, Z., Wang, G., Gao, S., 2018. Oxidative stress, cell cycle arrest, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*) induced by tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate. *Aquat. Toxicol.* 194, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.001>
- Coluzzi, E., Colamartino, M., Cozzi, R., Leone, S., Meneghini, C., O’Callaghan, N., Sgura, A., 2014. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PLoS One* 9, e110963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110963>
- Elizalde-Velázquez, A., Martínez-Rodríguez, H., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Islas-Flores, H., Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Lizcano-Sanz, I., Gómez-Oliván, L.M., 2017. Effect of amoxicillin exposure on brain, gill, liver, and kidney of common carp (*Cyprinus carpio*): The role of amoxicilloic acid. *Environ. Toxicol.* 32, 1102–1120. <https://doi.org/10.1002/tox.22307>
- Espe, M., Holen, E., He, J., Provan, F., Chen, L., Øysæd, K.B., Seliussen, J., 2015. Hydrolyzed fish proteins reduced activation of caspase-3 in H₂O₂ induced oxidative stressed liver cells isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Springerplus* 4, 658. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1432-6>

- Fahmi, T., Branch, L.D., Nima, Z.A., Jang, D.S., Savenka, A. V., Biris, A.S., Basnakian, A.G., 2017. Mechanism of graphene-induced cytotoxicity: Role of endonucleases. *J. Appl. Toxicol.* 37, 1325–1332. <https://doi.org/10.1002/jat.3462>
- Fahmy, M.A., Farghaly, A.A., Omara, E.A., Hassan, Z.M., Aly, F.A.E., Donya, S.M., Ibrahim, A.A.E., Bayoumy, E.M., 2017. Amoxicillin–clavulanic acid induced sperm abnormalities and histopathological changes in mice. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7, 809–816. <https://doi.org/10.1016/J.APJT.2017.08.002>
- Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A., 2011. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 251–275. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9>
- Formigari, A., Irato, P., Santon, A., 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects.
- García-Medina, S., Angélica Núñez-Betancourt, J., Lucero García-Medina, A., Galar-Martínez, M., Neri-Cruz, N., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., 2013. The relationship of cytotoxic and genotoxic damage with blood aluminum levels and oxidative stress induced by this metal in common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 96, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.010>
- Gómez-Oliván, L.M., Mendoza-Zenil, Y.P., SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., Ramírez-Durán, N., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. del C., Rodríguez-Fariñas, N., Islas-Flores, H., Elizalde-Velázquez, A., García-Medina, S., Pérez-Pastén Borja, R., 2017. Geno- and cytotoxicity induced on *Cyprinus carpio* by aluminum, iron, mercury and mixture thereof. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 135, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.037>
- Grollman, A.P., Moriya, M., 1993. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends*

- Genet. 9, 246–249. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90089-Z](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90089-Z)
- Hooper, D.C., 2001. Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones. Clin. Infect. Dis. 32, S9–S15. <https://doi.org/10.1086/319370>
- Houben, J.M.J., Moonen, H.J.J., van Schooten, F.J., Hageman, G.J., 2008. Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 44, 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.001>
- İstifli, E.S., Topaktaş, M., 2009. Cytogenetic genotoxicity of amoxicillin. Environ. Mol. Mutagen. 51, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/em.20531>
- Ji, K., Liu, X., Lee, S., Kang, S., Kho, Y., Giesy, J.P., Choi, K., 2013. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. J. Hazard. Mater. 254–255, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.036>
- Jin, A., Shi, X., Deng, W., Sun, J., Ji, H., 2019. Ameliorative effect of docosahexaenoic acid on hepatocyte apoptosis and inflammation induced by oleic acid in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Fish Physiol. Biochem. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00623-8>
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2007. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1161, 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.074>
- Köhler, C., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2002. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. J. Immunol. Methods 265, 97–110. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00073-X)

- Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* 54, 661–668. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.08.001>
- Li, P.-Y., Chang, Y.-C., Tzang, B.-S., Chen, C.-C., Liu, Y.-C., 2007. Antibiotic amoxicillin induces DNA lesions in mammalian cells possibly via the reactive oxygen species. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 629, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.02.005>
- Liu, Y., Wang, F., Chen, X., Zhang, J., Gao, B., 2015. Cellular responses and biodegradation of amoxicillin in *Microcystis aeruginosa* at different nitrogen levels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.011>
- Makpol, S., Abdul Rahim, N., Kien Hui, C., Wan Ngah, W.Z., 2012. Inhibition of Mitochondrial Cytochrome *c* Release and Suppression of Caspases by Gamma-Tocotrienol Prevent Apoptosis and Delay Aging in Stress-Induced Premature Senescence of Skin Fibroblasts. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/785743>
- Manzetti, S., Ghisi, R., 2014. The environmental release and fate of antibiotics. *Mar. Pollut. Bull.* 79, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.005>
- Matozzo, V., Battistara, M., Marisa, I., Bertin, V., Orsetti, A., 2016. Assessing the Effects of Amoxicillin on Antioxidant Enzyme Activities, Lipid Peroxidation and Protein Carbonyl Content in the Clam *Ruditapes philippinarum* and the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 521–527. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1902-8>
- Oliveira, R., McDonough, S., Ladewig, J.C.L., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A.,

- Domingues, I., 2013. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 903–912. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.019>
- Quan, Y., Gong, L., He, J., Zhou, Y., Liu, M., Cao, Z., Li, Y., Peng, C., 2019. Aloe emodin induces hepatotoxicity by activating NF- κ B inflammatory pathway and P53 apoptosis pathway in zebrafish. *Toxicol. Lett.* 306, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.007>
- Reyes-Becerril, M., Sanchez, V., Delgado, K., Guerra, K., Velazquez, E., Ascencio, F., Angulo, C., 2018. Caspase -1, -3, -8 and antioxidant enzyme genes are key molecular effectors following *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas veronii* infection in fish leukocytes. *Immunobiology* 223, 562–576. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.07.002>
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Barceló, D., Balcázar, J.L., 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res.* 69, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., González-González, E.D., Cardoso-Vera, J.D., Jiménez-Vargas, J.M., 2015. NSAID-manufacturing plant effluent induces geno- and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Sci. Total Environ.* 530–531, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.088>
- Sun, H.-J., Zhang, Y., Zhang, J.-Y., Lin, H., Chen, J., Hong, H., 2019. The toxicity of 2,6-dichlorobenzoquinone on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at developmental toxicity, oxidative stress, genotoxicity and cytotoxicity. *Environ.*

Pollut. 245, 719–724. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.051>

- Theodorakis, C.W., Swartz, C.D., Rogers, W.J., Bickham, J.W., Donnelly, K.C., Adams, S.M., 2000. Relationship between genotoxicity, mutagenicity, and fish community structure in a contaminated stream. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 7, 131–143. <https://doi.org/10.1023/A:1009971330138>
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–21.
- Van, P.H., Binh, P.T., Minh, N.H.L., Morrissey, I., Torumkuney, D., 2016. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2009–11 in Vietnam. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, i93–i102. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw069>
- Verleih, M., Borchel, A., Rebl, A., Brenmoehl, J., Kühn, C., Goldammer, T., 2019. A molecular survey of programmed cell death in rainbow trout: Structural and functional specifications of apoptotic key molecules. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 230, 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.01.012>
- von Zglinicki, T., Pilger, R., Sitte, N., 2000. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 64–74.
- Wang, Z., Li, G., Wu, Q., Liu, C., Shen, J., Yan, W., 2019. Microcystin-LR exposure induced nephrotoxicity by triggering apoptosis in female zebrafish. *Chemosphere* 214, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.103>
- Watkinson, A.J., Murby, E.J., Costanzo, S.D., 2007. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and

- wastewater recycling. *Water Res.* 41, 4164–4176.
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2007.04.005>
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., Matsumoto, H., 2002. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 128, 63–72.
<https://doi.org/10.1104/PP.128.1.63>
- Yuan, J., Murrell, G.A.C., Trickett, A., Wang, M.-X., 2003. Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 35–41.
- Zhdanov, D.D., Fahmi, T., Wang, X., Apostolov, E.O., Sokolov, N.N., Javadov, S., Basnakian, A.G., 2015. Regulation of Apoptotic Endonucleases by EndoG. *DNA Cell Biol.* 34, 316–326. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2772>
- Zheng, Q., Zhang, R., Wang, Y., Pan, X., Tang, J., Zhang, G., 2012. Occurrence and distribution of antibiotics in the Beibu Gulf, China: Impacts of river discharge and aquaculture activities. *Mar. Environ. Res.* 78, 26–33.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.03.007>
- Zhou, Z., Zhou, B., Chen, H., Tang, X., Wang, Y., 2019. Reactive oxygen species (ROS) and the calcium-(Ca²⁺) mediated extrinsic and intrinsic pathways underlying BDE-47-induced apoptosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadal cells. *Sci. Total Environ.* 656, 778–788. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.306>
- Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M., Fanelli, R., 2010. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 179, 1042–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.110>

1. Faria M, Valls A, Prats E, Bedrossiantz J, Orozco M, Porta JM, Gómez-OLiván LM, Raldúa D. 2019. Further characterization of the zebrafish model of acrylamide acute neurotoxicity: gait abnormalities and oxidative stress. *Scientific Reports*. Volume 9: 7075. SJR: 1.533. Publisher: Nature publishing group Quartile 1. DOI: [https://doi.org/ 10.1038/s41598-019-43647-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-43647-z)

