



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EMBRIOTOXICIDAD Y TERATOGENICIDAD INDUCIDA POR METFORMINA
Y GUANYLUREA EN EMBRIONES DE *Danio rerio*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. GUSTAVO AXEL ELIZALDE VELÁZQUEZ

DIRIGIDO POR:

DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN
DRA. MARÍA DOLORES HERNÁNDEZ NAVARRO
DRA. HARIZ ISLAS FLORES



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 2021

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por estar conmigo en cada momento de mi vida, y por darme la paciencia, fortaleza y salud para poder terminar exitosamente este proyecto.

A mis abuelos:

Por sus consejos que han sido de gran ayuda para mi crecimiento personal y profesional, y por su apoyo incondicional en mi vida.

A mis padres:

Por siempre buscar darme lo mejor, por darme una educación de calidad, por ser mi guía en los malos momentos, y por ser mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos:

Por impulsarme a salir adelante, por celebrar mis logros como los suyos y por alentarme a no rendirme aun cuando las situaciones no son las mejores.

Al Dr. Leo:

Por orientarme y ayudarme en todos los proyectos planeados durante mis estudios de posgrado, por su amistad y confianza, y sobre todo por impulsarme en mi formación como investigador.

A la Dra. Hariz y a la Dra. Lolita:

Por su amabilidad y disponibilidad para resolver mis dudas y por los conocimientos que me brindaron para formarme como persona y como profesional.

A mis amigos y compañeros del posgrado:

Por hacer de mis estudios de posgrado una experiencia mucho mas agradable, por su apoyo dentro y fuera del laboratorio, y por ayudarme a concretar los experimentos planeados durante estos dos años.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	8
<i>1. Vías de entrada de la metformina al medio ambiente acuático</i>	8
<i>2. Ocurrencia de la metformina y sus productos de transformación</i>	9
2.1. Agua residual	9
2.2. Agua superficial	12
2.3. Agua subterránea	13
2.4. Agua Potable	14
2.5. Lodo	14
<i>3. Efectos tóxicos de la metformina y la guanilurea en especies acuáticas</i>	15
3.1. Bioconcentración y bioacumulación	16
3.2. Efectos Tóxicos	18
3.2.1. Peces	18
3.2.2. Anfibios	23
3.2.3. Dáfnidos	23
3.2.4. Rotíferos	24
3.2.5. Mejillones	24
3.2.6. Caracoles	25
3.2.7. Plantas y algas	25
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MÉTODO	28
<i>1. Reactivos</i>	28
<i>2. Obtención de los ovocitos</i>	28
<i>3. Evaluación de la embriotoxicidad</i>	28
<i>4. Evaluación de los biomarcadores de estrés oxidativo</i>	29
<i>5. Índice de respuesta de biomarcadores integrados (IBR)</i>	31
<i>6. Análisis estadístico</i>	31
RESULTADOS	32
<i>1. Tasa de mortalidad y malformaciones</i>	32
1.1. Metformina	32
1.2. Guanilurea	32

2. <i>Tasa de eclosión</i>	33
2.1. Metformina	33
2.2. Guanylurea	36
3. <i>Efectos teratógenos</i>	36
3.1. Metformina	36
3.2. Guanylurea	37
4. <i>Evaluación del estrés oxidativo</i>	40
4.1. Actividad antioxidante producida por la metformina	40
4.2. Daño oxidativo producido por la metformina	40
4.3. Actividad antioxidante producida por la guanylurea	41
4.4. Daño oxidativo producido por la guanylurea	41
5. <i>IBR</i>	46
5.1. Metformina	46
5.2. Guanylurea	46
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIÓN	57
REFERENCIAS	58
ANEXOS	
1. <i>Artículo de revisión de la metformina</i>	
2. <i>Artículo de investigación metformina</i>	
3. <i>Carta de envío del artículo experimental de guanylurea</i>	

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Tasas de mortalidad, malformaciones y eclosión de los embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a MET ($\mu\text{g/L}$).	34
Fig. 2	Tasas de mortalidad, malformaciones y eclosión de los embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a GUA ($\mu\text{g/L}$).	35
Fig. 3	Principales malformaciones inducidas por cada concentración de MET en los embriones de <i>Danio rerio</i> .	38
Fig. 4.	Principales malformaciones inducidas por cada concentración de GUA en los embriones de <i>Danio rerio</i> .	39
Fig. 5.	Actividad de las enzimas antioxidantes, SOD A , CAT B y GPx C , en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a MET a las 72 hpf y 96 hpf.	42
Fig. 6.	Niveles de LPX A , HPx B y POx C , en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a MET a las 72 hpf y 96 hpf.	43
Fig. 7.	Actividad de las enzimas antioxidantes, SOD A , CAT B y GPx C , en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a GUA a las 72 hpf y 96 hpf.	44
Fig. 8.	Niveles de LPX A , HPx B y POx C , en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a GUA a las 72 hpf y 96 hpf.	45
Fig. 9.	Valores de IBR y gráficos en estrella de la respuesta al estrés oxidativo de los embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a MET.	47
Fig. 10	Valores de IBR y gráficos en estrella de la respuesta al estrés oxidativo de los embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a GUA.	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Prescripciones de metformina en 2018	8
Tabla 2	Ocurrencia mundial de la metformina y sus productos de degradación.	10
Tabla 3	Bioconcentración y bioacumulación de la metformina	16
Tabla 4	Toxicidad producida por metformina y guanilurea	21

RESUMEN

En los últimos años, el consumo de metformina (MET) ha aumentado no solo por la mayor prevalencia de diabetes tipo 2, sino también por su uso para otras indicaciones como el cáncer y el síndrome de ovario poli quístico. En consecuencia, la MET se encuentra actualmente entre las drogas de mayor peso liberadas a los ambientes acuáticos. Sin embargo, antes de que este fármaco sea liberado a los diferentes cuerpos de agua, esta es parcialmente biotransformado a su principal producto de degradación, la guanilurea (GUA), en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR). Dado que existe una gran brecha de conocimiento sobre la toxicidad de este fármaco y su metabolito en los organismos acuáticos, nuestro objetivo fue investigar el impacto de la MET y la GUA en el desarrollo embrionario y los biomarcadores de estrés oxidativo del pez cebra (*Danio rerio*). Para este efecto, los embriones de pez cebra (4hpf) se expusieron a varias concentraciones de MET (1, 10, 20, 30, 40, 50, 75 and 100 µg/L) y GUA (25, 50, 100, 200, 250, 25000, 50000, 75000 µg/L) hasta las 96 hpf. La MET aceleró significativamente el proceso de eclosión en todos los grupos de exposición, mientras que la GUA indujo un retraso en la eclosión de una manera dependiente de la concentración. Además, tanto la MET como su producto de transformación (TP) indujeron varias alteraciones morfológicas en los embriones, afectando su integridad y consecuentemente provocando su muerte. En cuanto al equilibrio oxidativo, la MET y la GUA indujeron significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes y los niveles de biomarcadores de daño oxidativo. Sin embargo, nuestro análisis de IBR demostraron que los biomarcadores de daño oxidativo tienen más influencia sobre los embriones. Por lo tanto, la MET y la GUA puede afectar el desarrollo embrionario del pez cebra y el estrés oxidativo puede estar involucrado en la generación de este proceso embriotóxico.

ABSTRACT

In recent years, the consumption of metformin (MET) has increased not only due to the higher prevalence of type 2 diabetes, but also due to their usage for other indications such as cancer and polycystic ovary syndrome. Consequently, metformin is currently among the highest drug by weight released into the aquatic environments. Nonetheless, before this drug was released into the aquatic environment, MET is partially bio transformed in guanylurea (GUA) in WWTPs. Since the toxic effects of this drug on aquatic species has been scarcely explored, the aim of this work was to investigate the influence of MET and its main metabolite on the development and redox balance of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. For this purpose, zebrafish embryos (4hpf) were exposed to several concentrations of MET (1, 10, 20, 30, 40, 50, 75 and 100 µg/L) and GUA (25, 50, 100, 200, 250, 25000, 50000, 75000 µg/L) until 96 hpf. Metformin significantly accelerated the hatching process in all exposure groups. Meanwhile, GUA delayed the hatching process in the embryos in a concentration dependent manner. Moreover, MET and GUA induced several morphological alterations on the embryos, affecting their integrity and consequently leading to their death. Concerning oxidative stress response, we demonstrated that MET and GUA induced the activity of antioxidant enzymes and increased the levels of oxidative damage biomarkers. However, our IBR analysis demonstrated that oxidative damage biomarkers got more influence over the embryos. Together these results demonstrated that MET and GUA may affect the embryonic development of zebrafish and that oxidative stress may be involved in the generation of this embryotoxic process.

INTRODUCCIÓN

La metformina (MET) es la terapia oral de primera línea y el agente oral más comúnmente recetado para tratar la diabetes tipo 2 (Foretz et al., 2014). No obstante, en los últimos años, numerosos estudios han sugerido su uso para otras indicaciones como: síndrome de ovario poli-quístico y cáncer (Zaidi et al., 2019; Bahrambeigi et al., 2020; Guan et al., 2020). En consecuencia, las prescripciones y el consumo de este fármaco están aumentando a nivel mundial, lo que lleva a su presencia en plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR). En las EDAR, la MET se biotransforma parcialmente en guanylurea (GUA) (Tisler y Zwiener, 2018), y debido a su carácter recalcitrante, ambos compuestos son liberados a los ambientes acuáticos donde pueden exhibir diferentes efectos tóxicos en organismos no objetivo.

Entre los efectos tóxicos que puede inducir la MET en las especies acuáticas se encuentran la alteración endocrina y la intersexualidad. Niemuth et al., 2015, por ejemplo, demostraron que 40 µg/L de este fármaco inducía la sobreexpresión de vitelogenina (VTG) en machos de *Pimephales promelas*. De manera similar, Crago et al., 2016 observaron un impacto en la expresión de la VTG, el receptor de estrógeno alfa y en la hormona liberadora de gonadotropina 3 (GnRH3) en *Pimephales promelas* juvenil en concentraciones tan bajas como 1 µg/L. De acuerdo con estos resultados, Lee et al., 2019 señalaron que la MET podría activar la AMPK al inhibir MRC I y, por tanto, afectar al eje hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG), lo que resulta en una alteración del sistema reproductivo.

Otra respuesta dañina que puede producir la MET en las especies acuáticas es la desregulación metabólica. Los embriones de trucha marrón expuestos a varias concentraciones de este fármaco (1 µg/L -1 000 µg/L) mostraron un aumento en la cantidad

de glucógeno hepático, especialmente en peces expuestos a la concentración más baja de MET (Jacob et al., 2018). De manera análoga, las primeras etapas de la vida de la Medaka japonesa expuesta a un rango de concentraciones relevantes de MET (1µg/L -100µg/L) mostraron una alteración significativa en la expresión de diferentes metabolitos asociados con la energía celular y las vías de proliferación/crecimiento celular (Ussery et al., 2018).

Con respecto a las respuestas tóxicas del desarrollo embrionario, solo se han realizado dos estudios en peces. En el primero, concentraciones ambientalmente relevantes de MET (1µg/L -100µg/L) redujeron significativamente las métricas de crecimiento y alteraron la expresión de genes asociados con el crecimiento celular (Ussery et al., 2018). Según los autores, estos resultados pueden proporcionar evidencia de que los escenarios de exposición ambiental actuales pueden ser suficientes para causar efectos en los peces en desarrollo. En desacuerdo con estos resultados, Jacob et al., 2018 señalaron que la mortalidad y el desarrollo de embriones de trucha marrón (48 dpf) no se vieron afectados después de la exposición a MET (1µg/L -1 000 µg/L). No obstante, sugirieron que otras especies podrían reaccionar de manera más sensible a la MET.

Si bien la información con respecto a la toxicidad de la MET es escasa, el perfil toxicológico de la GUA es aún más desconocido. Hasta ahora, apenas un estudio ha evaluado los efectos nocivos que puede inducir la GUA en los organismos acuáticos. En este estudio, los autores investigaron los posibles mecanismos por los cuales 1 ng/L de GUA puede afectar el desarrollo de las primeras etapas de la vida (ESL) de la Medaka japonesa. Según sus resultados, después de 28 días de exposición, la GUA puede alterar muchas vías importantes involucradas en la salud general de los peces. Entre las vías afectadas por la GUA, se incluyen la función y el desarrollo del sistema nervioso, el metabolismo celular, la comunicación y

estructura celular y la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (Ussery et al., 2021). Además, señalaron que concentraciones de GUA en varios órdenes de magnitud por debajo de las de MET inducían efectos de crecimiento similares en medaka japonesa. Esto es necesario recalcarlo, ya que como mencionamos anteriormente recientes estudios han demostrado que concentraciones ambientalmente relevantes de MET pueden inducir disrupción endocrina, intersexualidad y embriotoxicidad en diferentes especies acuáticas. Por lo tanto, se sugiere que estos efectos pudieran ser igualmente observados en organismos no objetivo expuestos a GUA.

Dado que existe una gran brecha de conocimiento sobre la toxicidad de este fármaco y su metabolito en los organismos acuáticos, nuestro objetivo fue investigar el impacto de la MET y la GUA en el desarrollo embrionario y los biomarcadores de estrés oxidativo del pez cebra (*Danio rerio*). Nuestra hipótesis es que concentraciones ambientalmente relevantes de la MET y la GUA serán capaces de interrumpir el desarrollo embrionario de este organismo de agua dulce, a través de un mecanismo de estrés oxidativo.

ANTECEDENTES

1. Vías de entrada de la metformina al medio ambiente acuático

Una de las rutas mediante las cuales la MET puede entrar al medio ambiente acuático es a través de su fabricación, la cual puede conducir a la descarga directa de este fármaco en sistemas de residuos líquidos o sólidos. Sin embargo, la principal vía de entrada de este fármaco a los ambientes acuáticos es a través de su consumo, tal y como se describe a continuación. Una vez que la MET es fabricada, esta se transporta y distribuye a las farmacias y hospitales, donde se prescribe para pacientes con diabetes tipo 2, cáncer y mujeres con SOP. La Tabla 1 resume los datos de consumo de la MET de algunos países en términos de recetas emitidas por año.

Tabla 1.
Prescripciones de metformina en 2018

Pais	Prescripciones por año (2018)	Fuente
EE. UU.	° 81,305,416	MEPS, 2018.
Inglaterra	21,163,271	Prescribing and Medicines Team Health and Social Care Information Centre, 2018.
Irlanda del Norte	435,432	Mulholland, 2018.
Gales	1,397,814	National Statistics Ystadegau Gwladol, 2018.
Escocia	1,249,597	Information Services Division National Services Scotland, 2018
Dinamarca	1,589,000	Sundhedsdata-Styrelsen, 2018.
Holanda	6,146,557	Zorginstituut Nederland, 2018.
Suecia	1,499,590	Socialstyrelsen, 2018.

° prescriptions in 2017

Una vez administrada, la MET se excreta de forma inalterada por la orina (Gong et al., 2012). De esta manera, este material de desecho ingresa a los sistemas de alcantarillado, donde la MET se transforma parcialmente en GUA, debido a la adaptación de bacterias en las tuberías de alcantarillado. Finalmente, este material de desecho se recolecta en las EDAR y se descarga directamente sin tratamiento al medio ambiente o bien pasa por una o más etapas de tratamiento antes de ser descargado como efluente en el medio acuático natural.

En el caso específico de que la MET sea tratada en las EDAR, esta puede transformarse bacterianamente en sus principales TP (GUA, MBG, 2,4-AMT, 2,4-DAT) (Tisler y Zwiener,

2018). Además, la cloración, fitorremediación y adsorción en óxido de grafeno (GO) son las únicas técnicas que han mostrado altas tasas de remoción (Quintão et al., 2016; Cui y Schröder et al., 2016; Moogouei et al., 2018; Zhu et al. , 2017). Sin embargo, estos tratamientos no se aplican en todas las EDAR. En consecuencia, se liberan grandes cantidades de MET y GUA al medio acuático, donde pueden presentar diferentes toxicidades en organismos no objetivo.

Otras vías de entrada de la MET al medio ambiente o incluso peor a la red alimentaria humana, son el uso de lodos de depuradora como fertilizantes y acondicionadores del suelo para el crecimiento de las plantas, y el riego de campos directamente con aguas residuales (Eggen y Lillo, 2012; Lesser et al., 2018).

2. Ocurrencia de la metformina y sus productos de transformación

La MET y la GUA tienen un K_{ow} de -4.3 y -2.5 a pH 7.4, respectivamente (ter Laak y Baken, 2014). Tomando en cuenta estas propiedades, se espera que la distribución en la fase acuosa de la MET y la GUA sea alta, lo que se demuestra por su presencia ubicua en la superficie, el suelo y el agua potable.

La Tabla 2 resume los datos recopilados de la literatura sobre la ocurrencia de MET y sus TP sobre su presencia en el medio acuático. Los datos recopilados tienen fechas entre 2014 y 2019 y se analizarán en las secciones siguientes.

2.1. Agua residual

La concentración máxima de MET en los afluentes de las EDAR fue de 702 $\mu\text{g/L}$, en EE. UU. (Oliverira et al., 2015). Este valor corresponde a una EDAR que recibe diariamente un 8% de los efluentes de un hospital de tamaño medio, con aproximadamente 600 camas.

Tabla 2.
Ocurriencia mundial de la metformina y sus productos de degradación.

Contaminante	País	Concentraciones (µg/L)								Fuente
		Afluente EDAR (min. – máx.)	Efluente EDAR (min. – máx.)	Agua Superficial (min. – máx.)	Agua Potable (min. – máx.)	Lodo (µg/g) (min. – máx.)	Agua subterránea (min. – máx.)	Efluente Hospitalario (min. – máx.)		
Metformina	Groenlandia	n.d	3.58 – 6.8	0.0331 – 0.748	n.d	0.455 – 0.553	n.d	n.d	n.d	Huber et al., 2016
		n.d	0.067 – 10.608	0.012 – 1.487	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Ghostrastidar et al., 2015
	Canadá	n.d	n.d	0.145 – 10.1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	De Solia et al., 2016
		n.d – 99	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Blair et al., 2015
	USA	6.06 – 720	0.401 – 58.9	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.009 - 630	Oliveira et al., 2015
		n.d	29.3 – 82.7	0.105 – 0.832	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Meador et al., 2016
		n.d	n.d	0.0014 – 2.635	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Bradley et al., 2016
		n.d	n.d	0.0104 – 4.308	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Bradley et al., 2017
	México	n.d	n.d	0.00239 – 0.281	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Bradley et al., 2017
		n.d	n.d	0.0105 – 0.903	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Elliot et al., 2017
n.d		n.d	n.d – 33.6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Elliot et al., 2017	
n.d		n.d	n.d – 0.21	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Weissinger et al. 2018	
Brasil	n.d	n.d	n.d – 7.13	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Bai et al., 2018	
	36.1 – 73.3	2.6 – 9.6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Xing et al., 2018	
	40.7 – 94.6	3.01 – 3.77	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Estrada-Arriaga et al., 2016	
	13.4 – 32.1	0.0576 – 0.21	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Estrada-Arriaga et al., 2016	
Polonia	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Lesser et al., 2018	
	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Pérez-Alvarez et al., 2018	
Islas Faroe	1.79 – 59	0.234 – 5.59	n.d	n.d	0.149 – 7.81	n.d	n.d	1.36 – 1.48	Luja-Mondragon et al., 2019	
	4.15 – 9.66	7.42 – 7.56	0.0614 – 0.0779	n.d	0.239 – 0.31	n.d	n.d	1.7 – 2.3	Chiarello et al., 2016	
Alemania	3.8187 – 16.7907	0.0075 – 0.0629	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Huber et al., 2016	
	86.2 – 142.3	3.4 – 6.4	0.001 – 0.643	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Koř-Wasik et al., 2016	
España	n.d	n.d	<0.46 – 1.66	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Trautwein et al., 2014	
	14 – 95	0.7 – 6.5	<0.001 – 0.47	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Posselt et al., 2018	
Portugal	n.d – 5.927	n.d – 1.252	n.d – 0.013	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Tisler, & Zwiener, 2018	
	70 – 325	0.05 – 58	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Carmona et al., 2017	
Rumania	n.d	n.d	0.1 – 0.24	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	de Jesus Gaffney et al., 2017	
	n.d	n.d	n.d – 0.44	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Moldovan et., 2018	
Grecia	n.d	n.d	n.d	n.d	0.0414 – 0.0782	n.d	n.d	n.d	Moldovan et., 2018	
	<0.0251 – 1.167	<0.0167 – 0.026	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Gago-Ferrero et al., 2015	
									Kosma et al., 2015	

		n.d	n.d	n.d	n.d	0.147–0.237	n.d	n.d	n.d	Thomaidi et al., 2016
Turquia	n.d	n.d	n.d	<0.00014 – 0.0141	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Guzel et al., 2018
Arabia Saudita	4.02 – 31.2	<3 – 4.51	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Shraim et al., 2017
	n.d	n.d	0.007 – 4.8009	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Ali et al., 2017
	n.d	n.d	0.051 – 2.917	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Kong et al., 2015
	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Kong et al., 2016
China	21 – 35	0.01 – 0.64	0.0016 – 5.8	0.0002 – 0.1214	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Yao et al., 2018
	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Asghar et al., 2018
	2.42 – 53.6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Yan et al., 2019
Vietnam	n.d	n.d	0.01 – 8.247	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Chau et al., 2018
Egipto	n.d	0.168 – 5.61	0.021 – 0.063	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Nguyen et al., 2018
Cameroon	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Mayoudom et al., 2018
Sudfrica	3.585 – 9.228	0.167 – 0.566	0.065 – 0.316	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Archer et al., 2017
	0.9 – 2.0	28.2 – 67.2	0.004 – 0.391	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Trautwein et al., 2014
Alemania	158 - 2100	26 - 810	<0.01 – 4.502	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Tisler, & Zwiener, 2018
	n.d	n.d	15 – 222	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Posselt et al., 2018
Grecia	<0.0196 – 0.084	<0.0283 – 0.627	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Kosma et al., 2015
China	0.004 – 5.4	15 – 28	0.0012 – 3.5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Yao et al., 2018

n.d: no disponible

Otros países con altas concentraciones de MET en los afluentes fueron Portugal con 325 $\mu\text{g/L}$ (de Jesus Gaffney et al., 2017) y Alemania con 142.3 $\mu\text{g/L}$ (Trautwein et al., 2014). En Portugal, las EDAR reciben aguas residuales urbanas e industriales de una red de alcantarillado combinada, lo que puede justificar las altas concentraciones de MET en el afluente. Sin embargo, lo que es aún más notable es que los valores de MET en los efluentes de las EDAR siguen siendo altos. Esto podría deberse a que los efluentes se trataron con un sistema biológico, el cual se sabe que es poco eficaz en la eliminación de MET.

Por otro lado, en Alemania, Trautwein et al., 2014, reportaron las concentraciones de afluentes y efluentes de una EDAR diseñada para 600,000 habitantes. Aunque esta EDAR también utiliza un tratamiento biológico, la MET se eliminó en un 95.5%, alcanzando una concentración máxima de 6.4 $\mu\text{g/L}$. No obstante, se detectó GUA en concentraciones preocupantes, con 67.2 $\mu\text{g/L}$ en los efluentes.

Más recientemente, Tisler y Zwiener, 2018 informaron que las concentraciones de GUA eran más altas que las concentraciones de MET. En este caso, no hubo una correlación directa entre la degradación de MET y la formación de GUA, ya que solo el 25% de la MET degradada se pudo encontrar como GUA. Esto indica que podría haber otros procesos de eliminación bióticos o abióticos para la MET que pueden formar otros TP como: la MBG, el 2,4-DAT y el 2,4-AMT. De hecho, en este estudio se detectó MBG en los efluentes con una concentración de 0.122 $\mu\text{g/L}$, y aunque el 2,4-DAT y el 2,4-AMT no se cuantificaron, ambos compuestos mostraron tendencias similares de respuesta creciente, con concentraciones más altas en el efluente que en el afluente.

2.2. Agua superficial

Cada vez hay más pruebas que sugieren que la MET y sus TP pasan o se forman en las EDAR, lo que significa que los efluentes son la principal fuente de contaminación de estos fármacos

en las aguas superficiales. Una vez que la MET y sus TP entran al medio ambiente, su presencia, persistencia y cantidad están determinadas en gran medida por el volumen de consumo, la tasa de eliminación en las EDAR y por un factor de dilución en las aguas superficiales. Por lo tanto, se espera que la concentración de MET y sus TP sea menor en los cuerpos de agua receptores.

Elliott et al., 2017b encontraron la concentración más alta de MET en muestras de agua superficial de EE. UU. Los investigadores recolectaron un total de 292 muestras de aguas superficiales de 12 afluentes estadounidenses. De todas estas muestras, la MET alcanzó una frecuencia de detección del 71% y una concentración máxima de 33.6 $\mu\text{g/L}$.

No obstante, como era de esperar, se han encontrado concentraciones más altas de GUA en aguas superficiales. Por ejemplo, en Alemania, Posselt et al., 2018 recolectaron múltiples muestras del río Erpe, que recibe los efluentes de varias EDAR más pequeñas y una EDAR grande. Entre todos los fármacos cuantificados, GUA alcanzó una concentración máxima de 222 $\mu\text{g/L}$.

2.3. Agua subterránea

La contaminación de las aguas subterráneas se ha convertido en una preocupación pública cada vez mayor, debido al aumento en la demanda de agua dulce. Sin embargo, en comparación con los numerosos esfuerzos realizados para evaluar la contaminación de las aguas superficiales, la calidad de las aguas subterráneas es relativamente poco conocida. Por lo tanto, hay poca información disponible sobre la calidad del agua subterránea, particularmente con respecto a la MET y sus TP. De 2014 a 2019, solo dos estudios informaron las concentraciones de MET en las aguas subterráneas. Kong et al., 2016 muestrearon 17 pozos domésticos en el norte de China, y reportaron una concentración máxima de 0.045 $\mu\text{g/L}$, con un 7.4% de frecuencia de detección. Por otro lado, Lesser et al.,

2018 recolectaron muestras de 17 pozos de agua subterránea del Valle del Mezquital, que recibe más del 70% de las aguas residuales generadas por el Área Metropolitana de la Ciudad de México (21 millones de habitantes). En este estudio, la MET alcanzó una concentración máxima de 0.029 $\mu\text{g/L}$.

2.4. Agua potable

El agua subterránea es la fuente más confiable de agua potable en muchas regiones del mundo. No obstante, las aguas superficiales y subterráneas están estrechamente relacionadas y pueden transferirse contaminantes de unas a otras. Por lo tanto, los recursos de agua subterránea están cada vez más amenazados por contaminantes químicos como la MET y sus TP, los cuales podrían potencialmente transferirse a los humanos a través del agua potable. En Polonia, Kot-Wasik et al., 2016 estudiaron el agua tratada, que es básicamente agua potable, de una planta de tratamiento de agua (WTP). Esta agua abastece a muchos distritos y varios pueblos de Polonia. Según sus resultados, la MET alcanzó un 64% de frecuencia de detección y una concentración máxima de 0.008 $\mu\text{g/L}$.

2.5. Lodo

Hasta la fecha, tres estudios han informado de la presencia de MET en lodos. Huber et al., 2016 recolectaron muestras de lodo de tres países diferentes, Islandia, Groenlandia y las Islas Feroe, y reportaron concentraciones de MET de 7.81 $\mu\text{g/g}$, 0.55 $\mu\text{g/g}$ y 0.31 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Los otros dos estudios se realizaron en Grecia. Gago-Ferrero et al., 2015 recolectaron lodos de depuradora de cinco EDAR y una isla. De acuerdo a sus resultados, la MET alcanzó una concentración máxima de 0.078 $\mu\text{g/g}$. Por último, Thomaidi et al., 2016 investigaron la presencia de 50 productos farmacéuticos, incluida la MET, en muestras

recogidas de una EDAR de Atenas. La MET se cuantificó con una concentración máxima de 0.23 $\mu\text{g/g}$.

Dado que la MET se usa ampliamente para el tratamiento de la diabetes, y su consumo ha aumentado de manera constante en los últimos años. Las actividades hospitalarias y los fabricantes de productos farmacéuticos son la principal fuente de estos contaminantes a través de los efluentes. Se recomienda que las instalaciones sanitarias y farmacéuticas controlen y evalúen sus descargas para reducir la carga de MET a cuerpos de agua sensibles. Se han encontrado MET y GUA en altas concentraciones en efluentes y aguas superficiales. Esto se debe a que la mayoría de los países carecen de técnicas eficientes para eliminar estos contaminantes de las EDAR. Los trabajos futuros deberían intentar mejorar la eficiencia de estas técnicas antiguas o desarrollar nuevas técnicas con altas tasas de eliminación. Finalmente, se conoce poca información sobre la ocurrencia de la GUA y los otros TP de la MET en el medio acuático. Los trabajos futuros deberían estimular la investigación para comprender el riesgo potencial de estos contaminantes para los cuerpos de agua.

3. Efectos tóxicos de la metformina y la guanilurea en especies acuáticas

Debido a sus altos volúmenes de descarga, su alta persistencia para la degradación y sus posibles efectos tóxicos sobre los organismos acuáticos, se sugiere que la MET y sus TP pueden convertirse en una amenaza mundial. Las siguientes secciones discutirán la bioacumulación de la MET y sus TP en animales y plantas acuáticas, así como también se discutirán los efectos tóxicos en organismos no objetivo. Para ello, los datos se resumieron en las Tablas 3 y 4.

3.1. Bioconcentración y bioacumulación

Las concentraciones de MET y GUA, así como los factores de bioconcentración (BCF) y los factores de bioacumulación (BAF) para estos compuestos en especies acuáticas se resumen en la Tabla 2.

Eggen y Lillo, 2012 investigaron la absorción y translocación de la MET en especies de plantas comestibles y encontraron que la MET se acumula en tejidos vegetales aceitosos. Las semillas de colza, por ejemplo, alcanzaron el valor más alto del BCF con 21,72. En comparación, los BCF para cereales (cereales trigo, cebada y avena) (0,29-1,35), tomate (0,02-0,06), calabaza (0,12-0,18), frijol (0,88) zanahoria (1,50-3,52) y patata (2,41) que fueron mucho más pequeños.

Tabla 3
Bioconcentración y bioacumulación de la metformina

Especie	Concentraciones de metformina (µg/g) (min-máx.)	BCF o BAF	Fuente
<i>Hordeum vulgare</i>	n.a – 5.0 * n.a – 2.65	BCF: 0.91	
<i>Vicia faba</i>	n.a – 4.85 * n.a – 4.25	BCF: 0.88	
<i>Solanum tuberosum</i>	13.27 – 15.83 * 2.60 – 5.66	BCF: 2.41	
<i>Avena sativa</i>	n.a	BCF: 1.35	Eggen and Lillo, 2012
<i>Brassica rapa</i>	n.a	BCF: 21.72	
<i>Brassica napus</i>	n.a	BCF: 20.63	
<i>Daucus carota</i>	n.a	BCF: 1.50 – 3.52	
<i>Solanum lycopersicum</i>	n.a	BCF: 0.02 – 0.06	
<i>Cucurbita pepo</i>	n.a	BCF: 0.12 – 0.18	
<i>Triticum aestivum</i>	n.a	BCF: 0.29	
<i>Lasmigona costata</i>	n.a – 0.00665	BAF: 0.66	De Solla et al., 2016
<i>Typha latifolia</i>	1.2913 – 1,462.13	BAF: 0.09 – 53.34	Cui and Schröder, 2016
<i>Leptocottus armatus</i>	n.a – 0.028 n.a – 0.0278	n.a BCF:1.42	Meador et al., 2017 Meador et al., 2018
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	n.a – 0.04 n.a – 0.0395	n.a BCF:1.42	Yeh et al., 2017 Meador et al., 2018
<i>Oryzias latipes</i>	n.a – 3,120	n.a	Ussery et al., 2018
<i>Leptophlebiae</i>	0.0402 - 0.312	n.a	
<i>Economidae</i>	n.a – 0.0284	n.a	Althakafy et al., 2018

Cui y Schröder, 2016 evaluaron la captación y translocación de la MET en *Typha latifolia*. Sus resultados mostraron que la concentración de MET, en las raíces, aumentó las dos primeras semanas del experimento, hasta un máximo de 1,462.13 µg/g. Sin embargo,

posteriormente estas de MET concentraciones disminuyeron, lo cual podría deberse a que la MET se trasladó a otros tejidos como rizomas y hojas.

Con respecto a los animales acuáticos, se han realizado seis estudios en cinco especies diferentes. Le Doujet, 2016 expuso juveniles de salmón del Atlántico a diferentes concentraciones de MET durante 3, 7 y 10 días. La cantidad detectada de este fármaco medida en intestinos y branquias fue relativamente baja en comparación con la concentración nominal de MET. Sin embargo, se observó un patrón de acumulación mayor de MET en las branquias al tiempo de exposición de 3 días.

De Solla et al., 2016 midieron las concentraciones de MET en mejillones de agua dulce del Grand River. Aunque los investigadores demostraron que los mejillones bioacumulan otras drogas, la MET no mostró una absorción o acumulación significativa en los mejillones.

Meador et al., 2017 estudiaron dos especies de peces de tres estuarios locales, el sculpin cuerno de ciervo y el salmón Chinook juvenil. De acuerdo con sus resultados, solo el sculpin cuerno de ciervo alcanzó una concentración de MET por encima de los límites reportados, con una concentración máxima de 0.028 µg/g.

Ussery et al., 2018 expusieron la etapa embrionaria y larvaria de la Medaka japonesa a 10 µg/L de MET durante 24h y 168h. Sus resultados sugieren que el endurecimiento del corion influyó en la absorción y acumulación de la MET, ya que los embriones expuestos a MET, antes del endurecimiento informaron tener concentraciones de MET más altas. Además, también cuantificaron la carga corporal de MET en las larvas y determinaron la velocidad a la que las larvas pueden depurar la MET, después de una exposición de 24 h. La carga corporal de MET alcanzó un máximo de 3,120 µg/g, y una vez que las larvas se transfirieron

a agua limpia, la MET se excretó rápidamente, con cargas corporales por debajo del límite de detección a las 24 h.

Finalmente, Althakafy et al., 2018, cuantificaron seis productos farmacéuticos y de cuidado personal en siete muestras de invertebrados. La MET se detectó en dos especies diferentes de insectos, *Leptophlebitidae* y *Economidae*. Las concentraciones máximas de MET encontradas en ambos invertebrados fueron 0.312 µg/g y 0.028 µg/g, respectivamente.

3.2. Efectos tóxicos

Para discutir los efectos tóxicos producidos por la MET y la GUA en organismos no objetivo, los resultados reportados se clasificaron según la especie en estudio, tal y como se muestra en la Tabla 3.

3.2.1. Peces

Pimephales promelas

Niemuth et al., 2015 evaluaron los efectos de la MET a concentraciones ambientalmente relevantes en pececillos de cabeza gorda. Sus resultados mostraron que la MET indujo un aumento significativo en los niveles de VTG en los machos de este pez, lo que indica una alteración endocrina. Se cree que la sobreexpresión de la VTG puede ocurrir como resultado de los efectos del fármaco sobre la señalización de la insulina.

Para el mismo año, Niemuth y Klaper, 2015 evaluaron la intersexualidad en los tejidos de los machos de *Pimephales promelas* expuestos a MET. Según sus resultados, los peces expuestos a la MET mostraron una alta incidencia de ovocitos en todo el tejido testicular. Lo que sugiere que la MET provoca el desarrollo de gónadas intersexuales en los machos, además de reducir la fecundidad.

Tres años después, Niemuth y Klaper, 2018 midieron la expresión de numerosos genes relacionados con el sistema endocrino. De acuerdo a sus resultados, los peces expuestos a

MET mostraron un aumento significativo en la expresión de AR, 3 β -HSD, 17 β -HSD, CYP19A1 y SULT2A1.

Danio rerio

Crago et al., 2016 informaron un aumento en la expresión de los receptores de kisspeptina a las 24 h posteriores a la fertilización (hpf). Además, después de 72 hpf, también aumentó la expresión de GnRH3. Este efecto puede explicarse porque la kisspeptina es vital para la regulación central de la actividad neurosecretora de GnRh.

Por otro lado, Monshi, 2017 evaluó los efectos conductuales de muchos contaminantes de drogas emergentes (EDC) en *Danio rerio*. Según sus resultados, la MET disminuyó la distancia máxima de nado de una manera dependiente de la concentración.

Finalmente, Godoy et al., 2018, reportaron la aparición de escoliosis y pigmentación anormal en los embriones de pez cebra expuestos a concentraciones de 1,100 mg/L de MET. Además, también realizaron un ensayo de comportamiento, donde se evaluó la actividad locomotora de embriones de pez cebra. Sin embargo, los investigadores informaron que la MET no parece alterar el comportamiento de natación.

Oryzias latipes

Lee, 2017, investigó los efectos de toxicidad aguda y crónica, así como los efectos de alteración endocrina que la MET producía en los embriones de este pez. En su estudio, los embriones alcanzaron una CL₅₀ de 383.3 mg/L y una NOEC de supervivencia de 100 mg/L. Además, los peces machos expuestos a MET mostraron efectos estrogénicos, debido a un aumento en la transcripción del gen de VTG.

Por su parte Ussery et al., 2018, demostraron que la MET disminuyó significativamente la longitud de los peces y el peso húmedo de las larvas de *Oryzias latipes*. Además, señalo que

varios metabolitos asociados con la energía y la proliferación celular se vieron significativamente alterados en las larvas . Un año después, Ussery et al., 2019 llevaron a cabo un estudio para caracterizar los efectos de la toxicidad de GUA sobre el crecimiento de larvas medaka, así como su persistencia hasta la edad adulta. Sus resultados mostraron que, de manera similar a la MET, la GUA también disminuyó significativamente la longitud de los peces y el peso húmedo de las larvas.

Finalmente, Lee et al., 2019 evaluaron diferentes biomarcadores de toxicidad reproductiva y estrés oxidativo en Oryzias latipes. Según sus resultados, los niveles de transcripciones de ER α y CYP19a estaban elevados en los peces machos, mientras que, en las hembras, la expresión génica de ER α 1 y VTG2 se redujo significativamente. Además, ellos observaron células en estadio de espermatogonio en las gónadas femeninas de los peces, lo sugiere que la MET causó una alteración endocrina en ambos sexos de *O. latipes*.

Betta splendens

MacLaren et al., 2018 realizaron un estudio de comportamiento para evaluar la agresividad de los peces luchadores de Siam después de una exposición crónica a MET. Después de 4 y 20 semanas, un iPad registró el número, la duración y la extensión de las aletas y los latidos de la cola. Sus resultados mostraron que los peces expuesto a MET mostraban menos agresión hacia un macho ficticio con respecto a los machos expuesto a la solución de control.

Tabla 4
Toxicidad producida por metformina y guanilurea

Especie	Concentración de metformina	Tiempo de exposición	Resultados	Fuente
<i>Pimephales promelas</i>	40 µg/L	365d	Machos: Intersexualidad (FNP frecuente y presencia de ovocitos alveolares corticales en los testículos). Males: VTG mRNA ↑	Niemuth and Klaper, 2015
	40 µg/L	28d	Juveniles: VTG mRNA, ERα mRNA, CYP3A126 mRNA, GnRH3 mRNA ↓	Niemuth et al., 2015
	1, 10, 100 µg/L	7d	AR mRNA, HSD3 mRNA, HSD17β mRNA, CYP19A1 mRNA y SULT2A1 mRNA ↓ EOMES mRNA ↑ KISS1 y KISS1R mRNA ↑	Crago et al., 2016
<i>Danio rerio</i>	40 µg/L	365d	GnRH3 mRNA ↓	Niemuth and Klaper, 2018
	12, 1, 121, 1210, 12100 ng/L	96h	Distancia máxima de nado ↓ LC50 = 383,3 mg/L	Johnson, 2018
	0, 1, 1, 10 µg/L	24h	KISS1 y KISS1R mRNA ↑	Crago et al., 2016
<i>Oryzias latipes</i>	0, 01, 0, 1, 1, 10, 100 µM	72h	NOEC (superfrendida) = 100 mg/L	Monshi, 2017
	20, 40, 80, 160, 320, 640 mg/L	24h	VTG1 mRNA y VTG2 mRNA ↑	Lee, 2017
	3, 10, 30, 100, 300 mg/L	96h	Males: E2, ERα mRNA, ERβ mRNA, VTG1 mRNA, VTG2 mRNA, FSHR mRNA, LHR mRNA, STAR mRNA, CYP11a mRNA, HSD3β mRNA, HSD11β2 mRNA y CYP11b mRNA ↓ T, 11-KT y CYP17 mRNA ↓	
	0, 03, 0, 3, 3, 30 mg/L	21d	Hembras: 11-KT y CYP11b mRNA ↑ HSD11B2 mRNA ↓ ET50 (depuración) = 4,88h	Ussery et al., 2018
	10 µg/L	24h	Niveles de ácido esteárico, ácido palmítico, metil-nicotinamida y ácido araquídico ↑ Peso, longitud, HCD mRNA, HGS mRNA ↓	
	1, 3, 2, 10, 32, 100 µg/L	28d	Hembras: 11-KT ↓ Peso y longitud ↓	Ussery et al., 2019
<i>Betta splendens</i>	3, 2 µg/L	165d	Machos: CYP19a mRNA, ERα mRNA y ROS ↑ VTG1 mRNA y GSH ↓	Lee et al., 2019
	* 1, 3, 2, 10, 32, 100 ng/L	28d	Intersexualidad	
	40, 120, 360 µg/L	4 semanas	Hembras: ERα mRNA y CAT ↑ ERβ1 mRNA y VTG2 mRNA ↓ Formación de células en etapa de espermatogonio	
	40, 120, 360 µg/L	15 semanas	Machos: Latidos de la cola y extensión de las aletas ↓	Maclaren et al., 2018

Especie	Concentración de metformina	Tiempo de exposición	Resultados	Fuente
<i>Salmo trutta fario</i>	1, 10, 100, 1000 µg/L	95d y 108d	Contenido de glucógeno hepático ↑ Peso ↓	Jacob et al., 2018
<i>Limnodynastes peronii</i>	0.5, 5, 50, 500 µg/L	30d	Niveles de glutamato, leucina, isoleucina, valina y ácido láctico ↑ Longitud ↓	Melvin et al., 2017
<i>Daphnia magna</i>	*5-150 mg/L 20, 40, 80, 160, 320 mg/L	48h 48h	EC ₅₀ (imovilización) = 40mg/L EC ₅₀ (imovilización) = 81.4 mg/L	Markiewicz et al., 2017 Lee, 2017
<i>Daphnia similis</i>	2.5, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L 5, 8, 12.5, 20, 30, 50 mg/L	21d 48h	NOEC (supervivencia) = 40 mg/L EC ₅₀ (imovilización) = 14.3 mg/L	Godoy et al., 2018
<i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Pleionus patulus</i> <i>Mytilus edulis</i>	1, 3, 5, 8, 11 mg/L 25, 50, 100, 200 µg/L 25, 50, 100, 200 µg/L 40 µg/L	14d 16d 16d 7d	EC ₁₀ (reproducción) = 4.4 mg/L r ↓ VTG mRNA ↑ NRRT y V9 mRNA ↓ Degeneración de gametos Hsp70 ↑ Peso ↓	García-García et al., 2017 Koeagouw and Ciocan, 2018 Jacob et al., 2019
<i>Planorbis corneus</i>	0.01, 0.1, 1, 10 mg/L	35d	Dilatación del lumen intestinal, alteración de las células digestivas (deformación de los núcleos, hiperplasia, hipertrofia y vacuolización) EC ₅₀ (inhibición del crecimiento) = 53.7 mg/L	Jacob et al., 2019
<i>Lemna minor</i>	6.2, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 mg/L	7d	EC ₁₀ (reproducción) = 701.8 mg/L	Godoy et al., 2018
<i>Hydra attenuate</i>	2300, 2700, 3100, 3600, 4200, 5000 mg/L	96h	LC ₅₀ = 3918 mg/L	
<i>Chlorella vulgaris</i>	200, 360, 650, 1200, 2000 mg/L 1.5, 76.8, 767.8 mg/L	7d 96h	NPQ ↑ ETR, α, EK and φPSII ↓	Cummings et al., 2018

*concentraciones de guanilurea; metformina + bezafibrato + atorvastatina mezcla de concentraciones; ; VTG: vitelogenina; ER: receptor de estrógenos; GnRH3: hormona liberadora de gonadotropina 3; KISS1: kisspeptina 1; KISS1R: receptor de kisspeptina; E2: 17β-estradiol; FSHR: receptor de la hormona estimulante del folículo; LHR: receptor de la hormona luteinizante; STAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda; HSD3β: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa / delta 5 delta 4-isomerasa; HSD11β2: 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2; T: testosterona; 11-KT: 11-cetotestosterona; NPQ: enfriamiento no fotoquímico; ETR: velocidad de transporte de electrones; α: transporte de electrones; Er: Irradiancia de saturación; φPSII: rendimiento cuántico efectivo del PSII; PNF: folículos perinucleolares; ROS: especies reactivas de oxígeno; GSH: glutatión; CAT: catalasa; NRRT: tiempo de retención de rojo neutro; V9: envoltura vitelina de la zona pelúcida/dominio 9; Hsp70: proteínas de shock térmico de 70; AR: receptor de andrógenos; HSD17β: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; SULT2A1: miembro 1 de la familia 2A de las sulfotransferasas; r: tasa de aumento de la población; HCD: β-3-hidroxiaci-CoA deshidrogenasa; HGS: Síntesis de HMG-CoA; EOMES: eomesodermina; MPO: mieloperoxidasa.

Salmo trutta fario

Con el objetivo de investigar si la MET afectan la micro biota intestinal y el metabolismo de los carbohidratos en la trucha marrón; Jacob et al., 2018 expusieron los embriones de *Salmo trutta fario* a 5 concentraciones diferentes de MET. En general, sus resultados mostraron que el glucógeno hepático aumentó en las larvas expuestas. Además, los investigadores, indicaron un efecto de la MET sobre las bacterias intestinales, con un aumento de protobacterias y una reducción de actino bacterias.

3.2.2. Anfibios

Limnodynastes peronii

En la medida de nuestro conocimiento, este es el único estudio encontrado que ha evaluado los efectos de la MET sobre el crecimiento y desarrollo de los anfibios. Melvin et al., 2017, expusieron a los renacuajos de *Limnodynastes peronii* a una mezcla de medicamentos ampliamente utilizados para tratar el síndrome metabólico. En sus resultados demostraron que los renacuajos no presentaban diferencias significativas en los niveles de triglicéridos hepáticos o el colesterol. Sin embargo, hubo un aumento de glutamato, leucina, isoleucina y valina.

3.2.3. Dafnidos

Daphnia magna

Para comprobar si la MET, la GUA y otros seis fármacos antidiabéticos orales podrían ser una amenaza eco toxicológica, Markiewicz et al., 2017 llevaron a cabo una prueba de inmovilización aguda en *Daphnia magna*. Al final de la prueba, los investigadores informaron un valor de $EC_{50}(\text{inmovilización})$ de 40 mg/L para GUA.

Como se mencionó anteriormente, Lee, 2017 investigó los efectos de toxicidad aguda y crónica de la MET, utilizando la *Medaka* japonesa. Sin embargo, en ese estudio, también

realizó una prueba de toxicidad aguda y crónica con *Daphnia magna*. En este caso, después de 48 h, los embriones alcanzaron una CE_{50} (inmovilización) de 81,4 mg/L. Además, la $NOEC$ (supervivencia) se determinó a los 21 días y obtuvo un valor de 40 mg/L.

Daphnia similis

Godoy et al., 2018 realizaron una prueba de toxicidad aguda y crónica. En ambas pruebas, los recién nacidos de *D. similis* fueron expuestos a diferentes concentraciones de MET, durante 48 horas y 14 días, respectivamente. En la prueba aguda se registraron dáfidos inmóviles, mientras que en la exposición crónica se evaluó la reproducción. Las CE_{50} alcanzaron un valor de 14.3 mg /L y 4.4 mg/L, respectivamente.

3.2.4. Rotíferos

Brachionus calyciflorus & Plationus patulus

Estas dos especies de rotíferos se utilizan ampliamente para probar los efectos tóxicos de los xenobióticos. Por ejemplo, García-García et al., 2017 cuantifican los cambios en el nivel de población en estos dos rotíferos expuestos a diferentes concentraciones de MET. Después de 16 días, el crecimiento de la población de ambos rotíferos se vio afectado negativamente por la MET.

3.2.5. Mejillones

Mytilus edulis

Como sugieren numerosos estudios, los niveles farmacéuticos, tanto en aguas superficiales como aguas subterráneas, se detectan en concentraciones más altas durante la estación seca. Basándose en esto, Koagouw y Ciocan, 2018 estudiaron los efectos acumulativos de la temperatura elevada y las altas concentraciones de MET. Según sus resultados, los mejillones expuestos a MET tuvieron una disminución en el tiempo de retención de rojo neutro (NRRT), lo que indica una notable desestabilización de la membrana lisosomal. Además, la MET

causó degeneración folicular y degradación de gametos, así como un aumento en la expresión de VTG.

3.2.6. Caracoles

Planorbarius corneus

Jacob et al., 2019 expusieron a los grandes caracoles Ramshorn a múltiples concentraciones de MET y GUA para evaluar su impacto en la salud de los gasterópodos. Las proteínas de estrés y los peróxidos lipídicos no mostraron cambios significativos. Sin embargo, en el análisis histopatológico se observó dilatación del lumen y una compartimentación alterada de las células digestivas. Estas reacciones observadas solo se encontraron en la concentración más alta de ambos contaminantes.

3.2.7. Plantas y algas

Lemna minor

Godoy et al., 2018, expusieron a las plantas de *L. minor* a múltiples concentraciones del fármaco antidiabético, MET. Después de 7 días, se determinaron las tasas de crecimiento de acuerdo con el área total de las frondas. El valor de CE50 fue de 53,7 mg/L.

Chlorella vulgaris

Este organismo es cosmopolita y comparte similitudes en la maquinaria fotosintética con las plantas terrestres. Tomando en cuenta lo anterior, Cummings et al., 2018 evaluaron si la MET afectaba negativamente la fotosíntesis de clorofilas. Según sus resultados, el valor de enfriamiento no fotoquímico (NPQ) aumentó con el tiempo, lo que sugiere que las células eran menos capaces de utilizar la misma cantidad de energía luminosa. Además, la velocidad de transporte de electrones y la irradiación mínima disminuyeron, lo que también indica una capacidad reducida para procesar energía luminosa.

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se ha despertado un especial interés sobre la presencia de varios fármacos y otros contaminantes en el ambiente. Sin embargo, este interés no se ha visto reflejado con investigación científica suficiente. De hecho, la presencia de productos farmacéuticos en los ecosistemas acuáticos continúa aumentando, con una nueva generación de compuestos farmacéuticos ahora frecuentemente detectados en el rango de ng/L a µg/L en aguas superficiales.

Actualmente, los productos farmacéuticos que generan un especial interés ambiental son aquellos que comparten las siguientes propiedades: 1) alto volumen de producción; 2) persistencia ambiental; y 3) actividad biológica. Propiedades que como mencionamos anteriormente la metformina cumple, y por tanto debe ser considerada un contaminante ambientalmente relevante.

Si bien es cierto en los últimos años, la cantidad de estudios que han evaluado la ocurrencia de la metformina en los diferentes cuerpos de agua, así como sus efectos tóxicos en organismos no objetivo han aumentado, aún es necesario ampliar nuestro conocimiento sobre este fármaco y su principal producto de degradación la guanylurea.

Tomando en cuenta lo anterior, una de las áreas que requiere mayor atención es el estudio de los efectos tóxicos en etapas tempranas de la vida de los peces, ya que solo dos estudios han evaluado los efectos de la metformina y la guanylurea en las larvas de *Salmo trutta fario* y *Oryzias latipes*. Sin embargo, los resultados obtenidos en ambos estudios aún no son concluyentes, dado que en un estudio los autores reportan que los embriones de *Salmo trutta fario* expuestos a metformina no presentaron ningún daño. Mientras que los embriones de *Oryzias latipes* expuestos a este fármaco y a su principal metabolito mostraron una alteración significativa en la expresión de genes asociados al crecimiento.

HIPÓTESIS

La exposición de ovocitos de *Danio rerio* a concentraciones de relevancia ambiental de metformina y guanylurea inducirán embriotoxicidad y teratogenicidad mediante el mecanismo de estrés oxidativo.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por metformina y su principal producto de degradación guanylurea en embriones de *Danio rerio*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analizar el daño al desarrollo embrionario producido por metformina y guanylurea en ovocitos de *Danio rerio* a través de los protocolos FET.
- Identificar y cuantificar las malformaciones generales y específicas del desarrollo en embriones de *Danio rerio*, inducidas por la exposición a metformina y guanylurea por el método de Hermsen.
- Evaluar el estrés oxidativo inducido por metformina y guanylurea sobre los ovocitos de *Danio rerio* mediante la cuantificación del grado de lipoperoxidación, el contenido de hidroperóxidos y la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa.

MÉTODO

1. Reactivos

El clorhidrato de metformina (número CAS: 1115-70-4) se adquirió en Toronto Research Chemicals (Toronto, ON). Se prepararon soluciones madre de MET a una concentración de 1 g / L en agua ultra pura. La sal de sulfato de N-guanylurea hidratada (número CAS: 207300-86-5) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se prepararon soluciones madre de GUA a una concentración de 10 g / L en agua ultra pura.

Asimismo, todos los demás reactivos eran de calidad analítica y se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), a menos que se indique lo contrario.

2. Obtención de los ovocitos

La noche anterior al desove, se eligieron varios machos y hembras adultos de pez cebra (proporción 2: 1) con un tamaño de 4-5 cm y se colocaron en cámaras de reproducción individuales. El desove fue estimulado por el inicio de la luz de la mañana. Los ovocitos se recolectaron, 1 hora después de la fertilización (hpf), se enjuagaron con agua ultrapura y se blanquearon según los métodos de Westerfield, 2007 y Varga, 2011. Los ovocitos fertilizados se clasificaron bajo un microscopio estereoscópico según el protocolo de Kimmel et al. 1995. Únicamente los ovocitos de en etapa de blástula media (equivalente a 2,5 hpf) fueron seleccionados y se mantuvieron incubados en placas Petri a $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta que estos alcanzaron la etapa de esfera (4 hpf).

3. Evaluación de la embriotoxicidad

Se seleccionaron setenta y dos embriones en la etapa de esfera (4hpf) y se distribuyeron aleatoriamente en placas de 24 pocillos (1 embrión por pocillo). Cada pocillo contenía 2 mL de solución de control (agua ultra pura) o una solución de prueba de MET o GUA,

respectivamente. En el presente estudio se utilizaron diferentes concentraciones de MET 0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 $\mu\text{g/L}$) y GUA (25, 50, 100, 200, 250, 25000, 50000, 75000 $\mu\text{g/L}$), las cuales se seleccionaron tomando en cuenta las concentraciones usadas en experimentos previos y las concentraciones reportadas en los diferentes cuerpos de agua. Las placas se mantuvieron a $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. La mortalidad de los embriones, la tasa de eclosión y la tasa de malformaciones se evaluaron en diferentes momentos (12, 24, 48, 72 y 96 hpf) durante la exposición a MET y GUA. La tasa de malformación se expresó como el porcentaje de embriones con al menos una malformación en comparación con el control. Se construyó un gráfico con las principales malformaciones corporales producidas por GUA en embriones de *Danio rerio* utilizando el software IBM SPSS Statistics 22. La mortalidad también se documentó diariamente utilizando un microscopio estereoscópico. Los embriones muertos se descartan todos los días. Una vez finalizado el tiempo de exposición, contamos los embriones vivos muertos y malformados y luego realizamos un análisis de regresión lineal de máxima verosimilitud para determinar la CL50 y la CE50m con sus intervalos de confianza del 95% ($p < 0,05$). Se utilizó el método de Spearman-Kärber recortado (software US-EPA ver 1.5).

4. Evaluación de los biomarcadores de estrés oxidativo

Se formaron 17 lotes, cada uno con 1600 *Danio rerio* en la etapa de esfera, en acuarios de 4 litros de capacidad. De los lotes formados, los primeros 16 se expusieron a todas las concentraciones de MET y GUA, respectivamente. Mientras que el último lote se expuso a la solución de control (agua ultra pura). La temperatura se mantuvo a $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en todos los lotes. En cada punto final (72 hpf y 96 hpf), se seleccionaron al azar 800 embriones de cada lote y se homogeneizaron en 1 ml de solución tampón de fosfato (PBS, pH 7,4). Estos puntos finales se seleccionaron porque en ese momento las larvas de pez cebra ya habían

eclosionado y su sistema enzimático ya estaba funcionando. Las muestras se separaron en dos tubos Eppendorf. Por un lado, el tubo 1 contenía 300 μ L del homogeneizado y 300 μ L de una solución de ácido tricloroacético (TCA, 20%). Por otro lado, el tubo 2 contenía 700 μ L del homogeneizado. Todos los tubos se mantuvieron a -20°C hasta su uso. El tubo 1 se centrifugó a 11 495 rpm durante 15 min a 4°C y el precipitado se utilizó para determinar el contenido de carbonilo proteico (POx), mientras que el sobrenadante se utilizó para determinar el grado de LPX y el contenido de hidroperóxido (HPx). El tubo 2 se centrifugó a 12 500 rpm durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx).

Para la cuantificación de todos los biomarcadores de estrés oxidativo se utilizaron diferentes métodos enzimáticos y colorimétricos. Los niveles de LPX, por ejemplo, se evaluaron con el ensayo de ácido tiobarbitúrico documentado por Buege y Aust, (1978). De manera similar, la reacción de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina, informada previamente por Levine et al., 1994, se usó para evaluar la POx. Además, HPx se cuantificó utilizando el ensayo de oxidación ferrosa-xilenol explicado por Jiang et al., 1992.

Con respecto a las enzimas antioxidantes, el método de Radi et al., 1991, que se basa en el consumo de H_2O_2 exógeno, se utilizó para evaluar la actividad de CAT. Para la determinación de SOD se llevó a cabo el método de Misra y Fridovich, 1972, que miden la capacidad de SOD para inhibir la auto oxidación de la epinefrina a pH 10,2. Finalmente, la GPX se determinó mediante el procedimiento descrito por Gunzler y Flohe-Clairborne, 1985, que evalúan la reducción neta de glutatión S-transferasa en 1 min a 37°C y pH 7.

Los resultados del estrés oxidativo se normalizaron frente a las proteínas totales, que se midieron con el método de Bradford, 1976.

5. Índice de respuesta de biomarcadores integrados (IBR)

Nuestros resultados de los biomarcadores de estrés oxidativo se aplicaron al índice IBR, previamente informado por Sánchez et al., 2013. Brevemente, para la determinación de IBR, obtuvimos la relación entre todos los biomarcadores de cada grupo de tratamiento (X_i) y los biomarcadores del grupo de control (X_0). A continuación, esta relación (X_i/X_0) se transformó logarítmicamente (Y_i) para reducir la varianza. Con la finalidad de estandarizar los valores de Y_i , se utilizó la siguiente fórmula $Z_i = (Y_i - \mu)/s$, con la media (μ) y la desviación estándar (s) de Y_i . A continuación, se calculó el índice de desviación del biomarcador (A) mediante la diferencia entre Z_i y Z_0 . Los valores A se representaron en un gráfico de estrellas que representa las respuestas integradas de biomarcadores. Además, se sumó el valor absoluto de A de cada biomarcador para obtener los valores de IBR.

6. Análisis estadístico

Los datos de los biomarcadores de estrés oxidativo se evaluaron con un análisis de varianza bidireccional (ANOVA), considerando el tiempo como factor A y la concentración como factor B. Las variaciones entre las medias se evaluaron con el método de Student-Newman-Keuls. Los datos sobre efectos embriotóxicos y teratogénicos se evaluaron utilizando la prueba exacta de Fisher. Se aceptó la significancia cuando $p < 0,05$, utilizando el software SigmaPlot 12.3.

RESULTADOS

1. Tasa de mortalidad y malformaciones

1.1. Metformina

La tasa de mortalidad acumulada de los embriones de pez cebra expuestos a cada concentración de MET se muestra en la Fig. 1A. En comparación con el grupo de control, la MET aumentó significativamente la tasa de mortalidad en los embriones de pez cebra de una manera dependiente del tiempo y la concentración, alcanzando el mayor número de embriones muertos a la concentración de 75 $\mu\text{g/L}$. Si bien, para la concentración de 100 $\mu\text{g/L}$, la tasa de mortalidad fue significativamente mayor que la de los controles, esta fue mucho menor que en el resto de las concentraciones.

Al igual que en la tasa de mortalidad, la MET aumentó considerablemente la tasa de malformaciones, alcanzando el pico máximo a la concentración de 75 $\mu\text{g/L}$ (Fig. 1B). Después de esta concentración, la MET mostró una importante disminución en el número de embriones malformados. Teniendo en cuenta estos datos, se calcularon la CL_{50} y la $CE_{50(\text{malformaciones})}$, obteniendo un valor de 3.25 $\mu\text{g/L}$ y 0.37 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Además, el índice teratogénico de la MET en *Danio rerio* obtuvo un valor de 8,8. De acuerdo con los criterios de Weigt et al., 2011, la MET debería clasificarse como teratogénica.

1.2. Guanylurea

En comparación con el grupo de control, la GUA aumentó la tasa de mortalidad y malformaciones en los embriones de una manera dependiente de la concentración (Fig. 2A-B). La mayor tasa de mortalidad y malformaciones se obtuvo a la concentración de 75,000 $\mu\text{g/L}$ de GUA. Si bien una concentración de 75,000 $\mu\text{g/L}$ para cualquier compuesto tóxico no es relevante para el medio ambiente, cabe señalar que la tasa de mortalidad promedio de la GUA a una concentración de 200 $\mu\text{g/L}$ fue del 70.8%. Además, a esa concentración, el

86.1% de los embriones se encontraron con al menos una malformación. Concentración que se ha informado previamente en aguas superficiales de Alemania (Posset et al., 2018).

Se calcularon la CL₅₀ y la CE₅₀(malformaciones), obteniendo un valor de 38.5 µg/L y 18.5 µg/L, respectivamente. Además, el índice teratogénico de la GUA en *Danio rerio* obtuvo un valor de 2.1. Teniendo en cuenta los criterios de Weigt et al., 2011, la GUA también debe clasificarse como teratogénica.

2. Tasa de eclosión

2.1. Metformina

Las tasas de eclosión de los embriones de pez cebra expuestos a MET y agua ultra pura se muestran en la Fig. 1C. Como puede verse en esta figura, a las 24 hpf, los embriones expuestos a 10µg/L, 20µg/L y 30µg/L de MET comenzaron a emerger del corion. Sin embargo, este proceso sólo resultó estadísticamente significativo para las dosis de MET de 10 µg/L y 20 µg/L. A las 48 hpf, la tasa de eclosión para todos los grupos de exposición aumentó significativamente en comparación con el grupo de control. El mayor número de embriones descorionados se obtuvo para la concentración de 75 µg/L de MET. Además, a la concentración de 100 µg/L, la tasa de eclosión disminuyó notablemente en comparación con el resto de los grupos de tratamiento. 24 horas después, a las 72 hpf, la mayoría de los embriones del grupo de control y del grupo tratado con MET habían eclosionado. En este momento, ninguno de los grupos de tratamiento mostró una diferencia significativa en comparación con el grupo de control. Finalmente, a las 96 hpf, todos los embriones de los grupos de control y de tratamiento habían eclosionado.

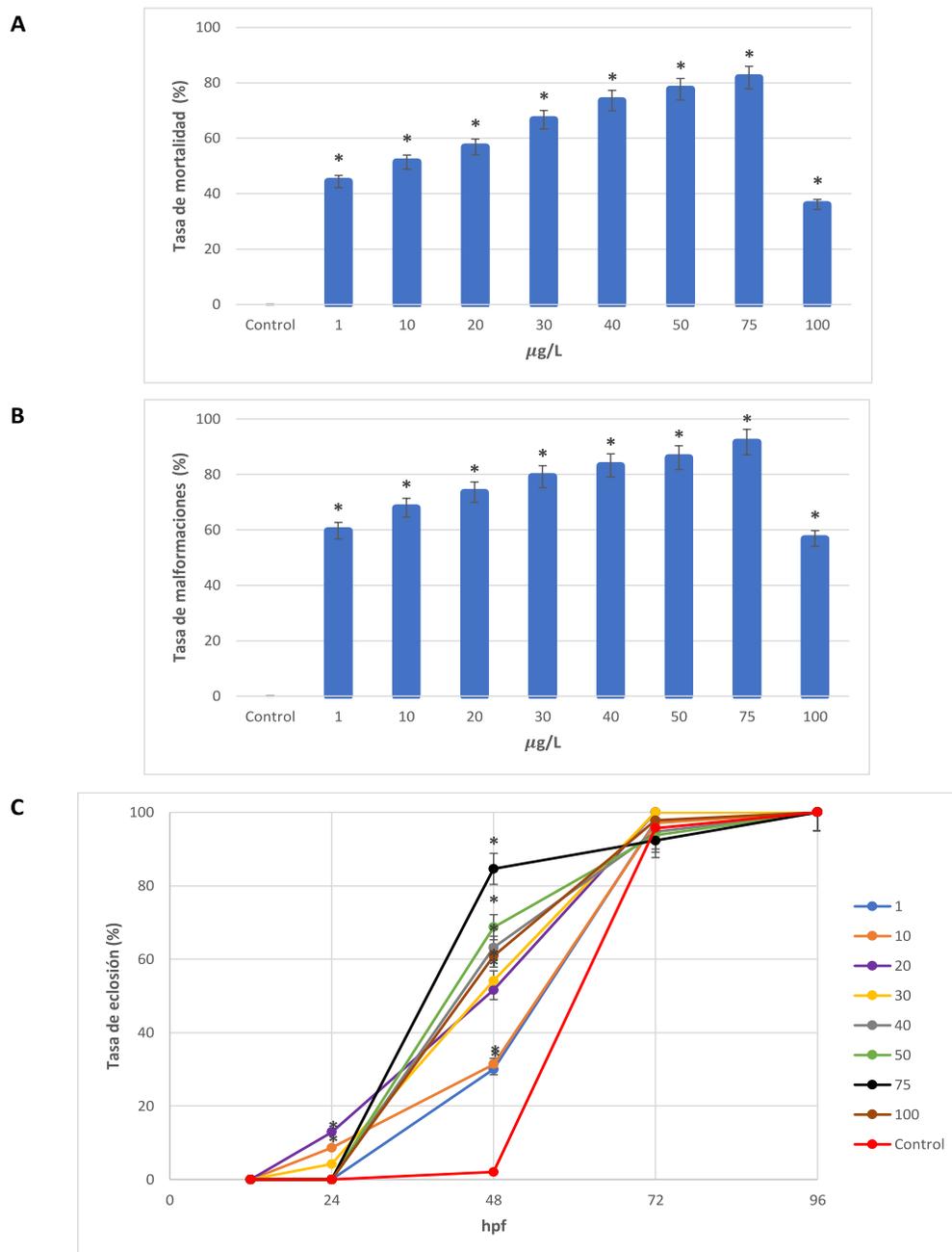


Fig. 1. Tasas de mortalidad, malformaciones y eclosión de los embriones de *Danio rerio* expuestos a MET ($\mu\text{g/L}$). **A** representa la tasa de mortalidad acumulada de los embriones de pez cebra expuestos a cada concentración de MET a las 96 hpf. **B** representa la tasa acumulada de malformaciones de los embriones de pez cebra expuestos a cada concentración de MET a las 96 hpf. **C** representa la tasa de eclosión acumulada de los embriones de pez cebra expuestos a cada concentración de MET a 12, 24, 48, 72 y 96 hpf. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (SEM) de tres experimentos independientes. * denota un cambio significativo con $P < 0.05$.

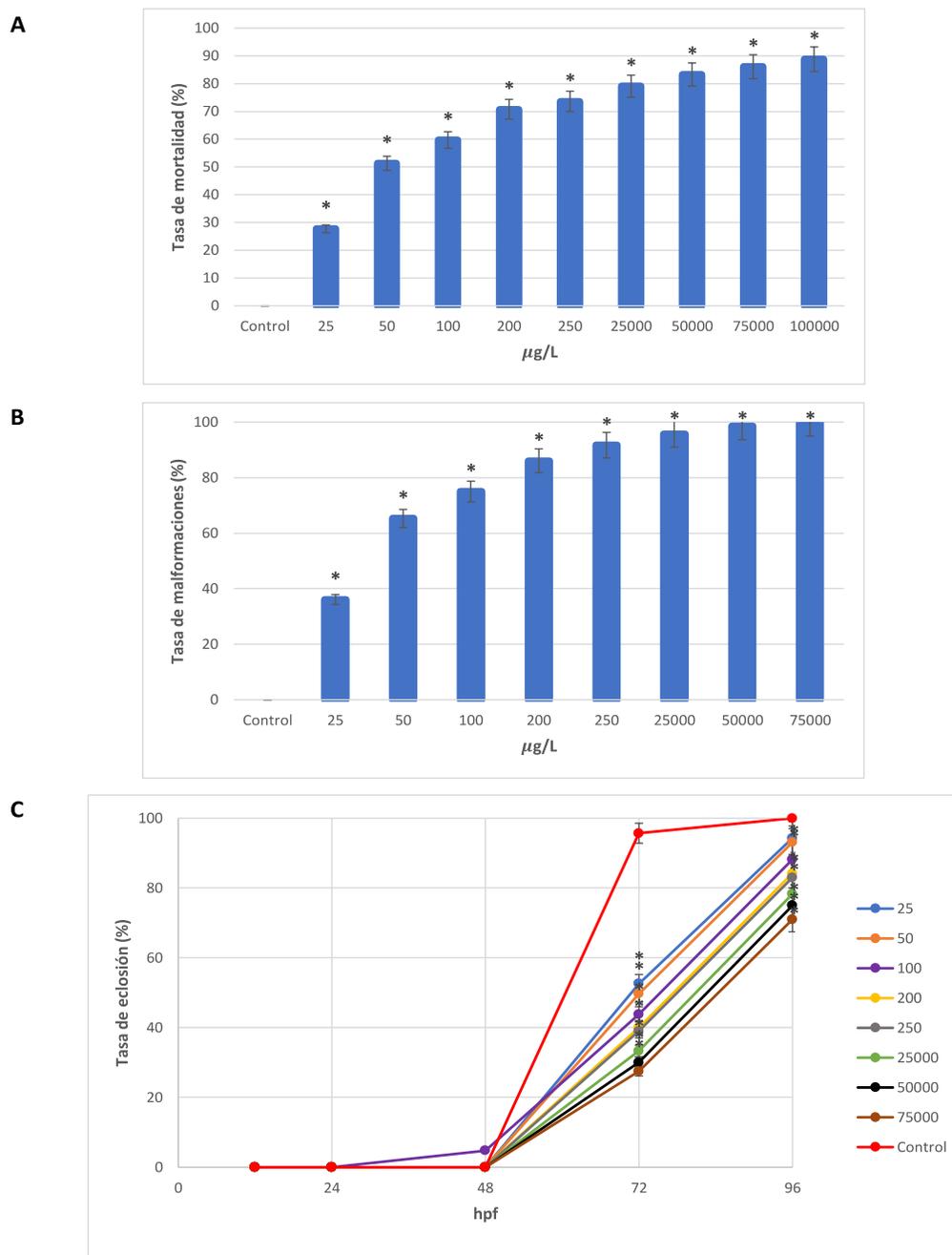


Fig. 2. Tasas de mortalidad, malformaciones y eclosión de los embriones de *Danio rerio* expuestos a GUA ($\mu\text{g/L}$). **A** representa la tasa de mortalidad acumulada de los embriones de pez cebra expuestos a cada concentración de GUA a las 96 hpf. **B** representa la tasa acumulada de malformaciones de los embriones de pez cebra expuestos a cada concentración de GUA a las 96 hpf. **C** representa la tasa de eclosión acumulada de los embriones de pez cebra expuestos a cada concentración de GUA a 12, 24, 48, 72 y 96 hpf. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (SEM) de tres experimentos independientes. * denota un cambio significativo con $P < 0.05$.

2.2. Guanylurea

Las diferencias en las tasas de eclosión entre los embriones de pez cebra expuestos a GUA y el grupo de control se muestran en la Fig. 2C. Como se muestra en esta figura, los embriones expuestos a 100 $\mu\text{g/L}$ de GUA comenzó a emerger del corion a las 48 hpf. Sin embargo, este proceso no fue estadísticamente significativo. En comparación con el grupo de control, se observó una disminución significativa en la tasa de eclosión en todos los grupos de exposición, a 72 y 96 hpf. Además, esta disminución en la tasa de eclosión mostró ser de una manera dependiente de la concentración, alcanzando el menor número de embriones descoronados a la concentración de 75000 mg/L . A concentraciones ambientalmente relevantes, la GUA también mostró una reducción importante en la tasa de eclosión. Las concentraciones cercanas a los 200 $\mu\text{g/L}$, por ejemplo, redujeron la tasa de eclosión en un 16%.

3. Efectos teratógenos

3.1. Metformina

Durante todo el período de exposición, el desarrollo de los embriones en el grupo de control fue normal. A diferencia del grupo de control, la MET causó malformaciones corporales en todos los grupos de tratamiento y tiempo de exposición (Fig. 3A). Las malformaciones observadas incluyeron malformación de la cola, escoliosis, edema pericárdico, deformación de la yema, hipo pigmentación, retraso del proceso de eclosión, ausencia de aleta, ausencia de ojo y malformación craneofacial. Entre estas, las malformaciones más pronunciadas fueron la malformación de la cola y la escoliosis (Fig. 3B). Como se puede observar en la figura 3, la severidad de las malformaciones se hizo más evidente a medida que aumentaba la concentración, mostrando una mayor incidencia de embriones con edema pericárdico,

deformación de la yema, ausencia de ojo y malformación craneofacial. Las malformaciones más graves se observaron en los embriones expuestos a 75 µg/L. Después de esta concentración, la MET mostró una disminución significativa en la gravedad de las malformaciones.

3.2. Guanylurea

Durante todo el período de exposición, el desarrollo de los embriones en el grupo de control fue normal. Por el contrario, la GUA causó varias malformaciones corporales en todos los grupos de tratamiento y tiempo de exposición (Fig. 4A). Las malformaciones observadas incluyeron malformación de la cola, escoliosis, edema pericárdico, deformación de la yema, hipo pigmentación, retraso del proceso de eclosión, ausencia de aleta, ausencia de ojo y malformación craneofacial. Entre estas, las malformaciones más pronunciadas fueron la malformación de la cola y la escoliosis (Fig. 4B). Además, es de destacar que la severidad de las malformaciones fue más evidente a medida que aumentaba la concentración. Por ejemplo, a medida que aumentaba la concentración, también aumentaba la incidencia de embriones con edema pericárdico, deformación de la yema, ausencia de aleta, ausencia de ojo y malformación craneofacial. Las malformaciones más graves se observaron en los embriones expuestos a 75000 µg/L. No obstante, a concentraciones ambientalmente relevantes, la GUA también indujo malformaciones que pueden afectar la integridad de los peces y provocar su muerte.

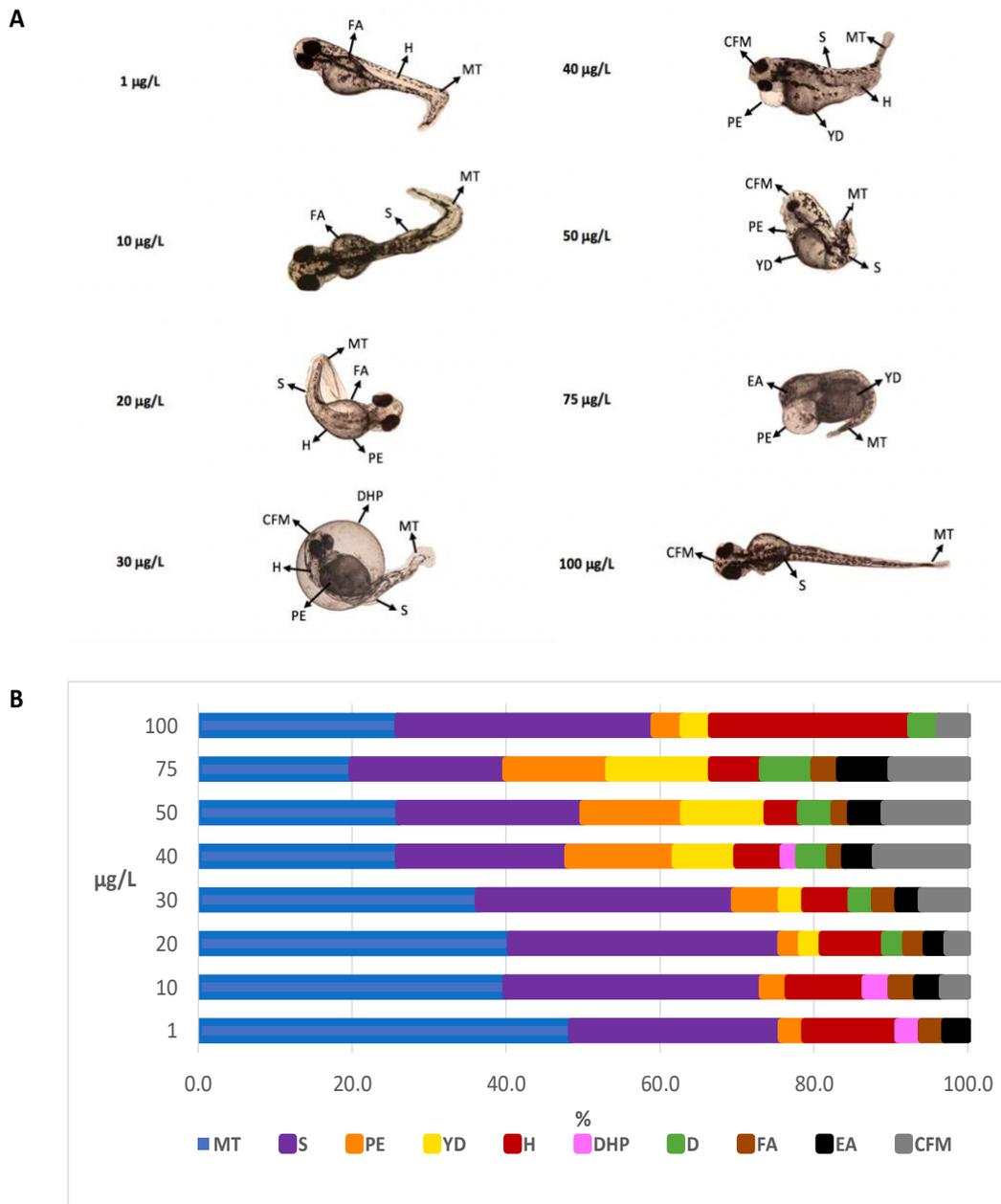


Fig. 3. Principales malformaciones inducidas por cada concentración de MET en los embriones de *Danio rerio*. **A** Fotos representativas de las anomalías morfológicas que presentaron los embriones de pez cebra expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de MET a las 96 hpf. Las flechas indican todas las malformaciones encontradas en cada embrión. **B** Incidencia acumulada de cada malformación encontrada en los embriones de pez cebra expuestos a MET, expresada en porcentaje. Los datos se expresan como media \pm error estándar (SEM) de tres experimentos independientes. MT: malformación de la cola; S: escoliosis; PE: edema pericárdico; YD: deformación del saco vitelino; H: hipo pigmentación; DHP: retraso del proceso de eclosión; FA: ausencia de aletas; EA: ausencia de ojos; CFM: malformación craneofacial.

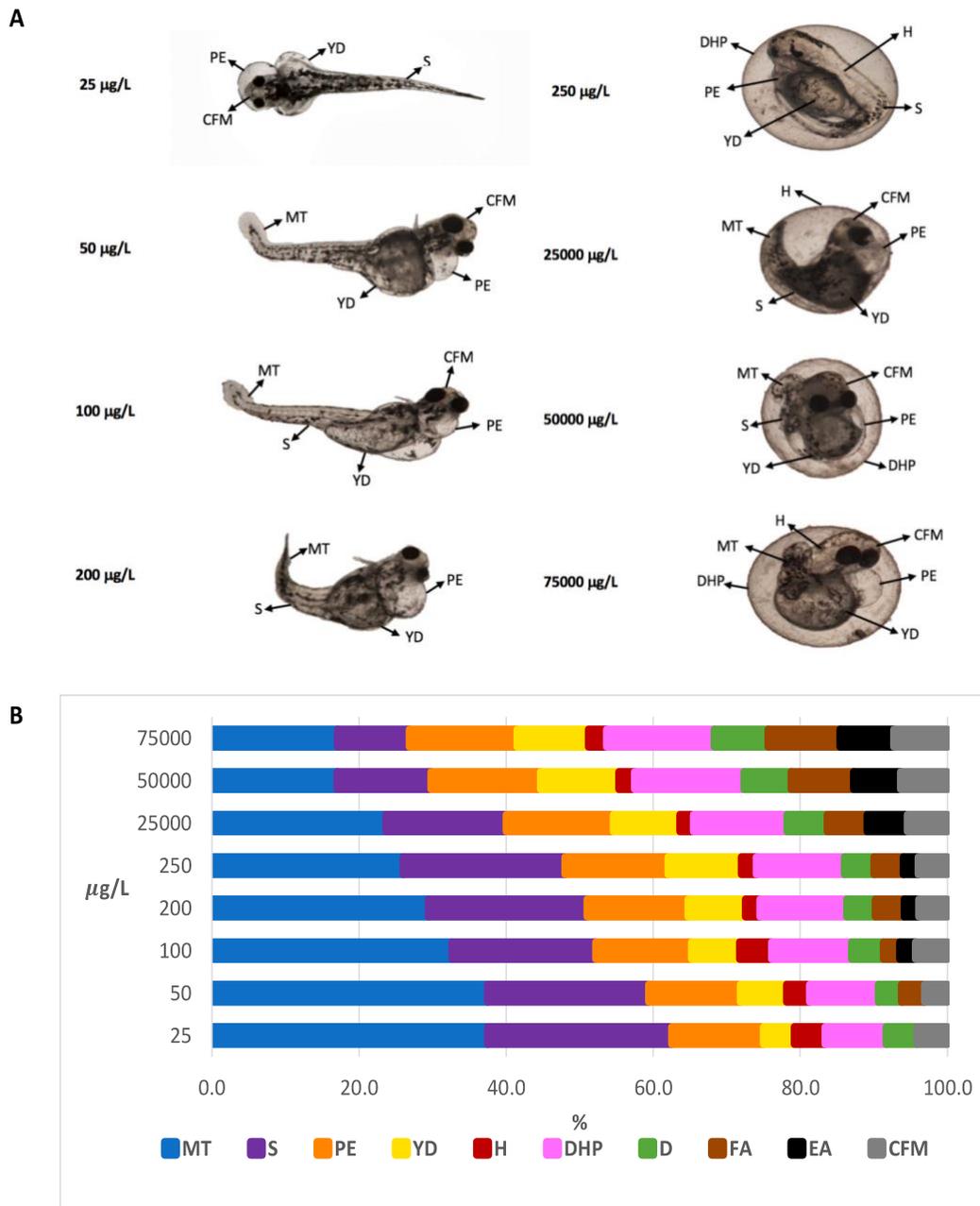


Fig. 4. Principales malformaciones inducidas por cada concentración de GUA en los embriones de *Danio rerio*. **A** Fotos representativas de las anomalías morfológicas que presentaron los embriones de pez cebra expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de GUA a las 96 hpf. Las flechas indican todas las malformaciones encontradas en cada embrión. **B** Incidencia acumulada de cada malformación encontrada en los embriones de pez cebra expuestos a GUA, expresada en porcentaje. Los datos se expresan como media \pm error estándar (SEM) de tres experimentos independientes. MT: malformación de la cola; S: escoliosis; PE: edema pericárdico; YD: deformación del saco vitelino ; H: hipo pigmentación; DHP: retraso del proceso de eclosión; FA: ausencia de aletas; EA: ausencia de ojos; CFM: malformación craneofacial.

4. Evaluación del estrés oxidativo

4.1. Actividad antioxidante producida por la metformina

La actividad antioxidante de SOD, CAT y GPx, en los embriones de *Danio rerio* expuestos a MET se muestra en la Fig. 5. Como puede verse en esta figura, la actividad de todas las enzimas, en todos los grupos de exposición, mostró un aumento significativo en comparación con el control. grupo. Además, a medida que aumentaba la concentración, también aumentaba la actividad de las enzimas, alcanzando el pico máximo a la concentración de 75 $\mu\text{g/L}$. Después de esta concentración, la actividad de todas las enzimas disminuyó significativamente en comparación con el resto de los grupos de tratamiento. En cuanto al tiempo de exposición, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la SOD. No obstante, a la concentración de 50 $\mu\text{g/L}$, la actividad enzimática de CAT mostró un aumento significativo a las 96 hpf en comparación con las 72 hpf. Además, la actividad enzimática de GPx se incrementó significativamente a las concentraciones de 40 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$ y 75 $\mu\text{g/L}$ de una manera dependiente del tiempo.

4.2. Daño oxidativo producido por la metformina

Los niveles de LPX, HPx y POx en embriones de *Danio rerio* expuestos a MET se muestran en la Fig. 6. Al igual que en las enzimas antioxidantes, los niveles de todos los biomarcadores de daño oxidativo, en todos los grupos de exposición, exhibieron un aumento significativo en comparación con el grupo de control. Además, los niveles de todos los biomarcadores de daño oxidativo aumentaron a medida que aumentaba la concentración, alcanzando el pico más alto con una dosis de 75 $\mu\text{g/L}$ de MET. Por otro lado, a una concentración de 100 $\mu\text{g/L}$, los niveles de LPX, HPx y POx disminuyeron considerablemente en comparación con el resto de los grupos de tratamiento. En cuanto al tiempo de exposición, los niveles de LPX y HPx aumentaron significativamente a las concentraciones de 50 $\mu\text{g/L}$ y 75 $\mu\text{g/L}$. Sin

embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de POx a las 96 hpf en comparación con las 72 hpf.

4.3. Actividad antioxidante producida por la guanylurea

La actividad antioxidante de SOD, CAT y GPx, en embriones de *Danio rerio* expuestos a GUA se muestra en la Fig.7. A partir de esta imagen, se puede ver que la actividad de las enzimas, en todos los grupos de exposición, mostró un aumento significativo en comparación con el grupo de control. Además, conforme la concentración aumentaba, la actividad de las enzimas también aumentó, alcanzando el pico máximo a la concentración de 75000 µg/L. En cuanto al tiempo de exposición, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de CAT. No obstante, en comparación con las 72 hpf, la actividad enzimática de CAT y GPX mostró un aumento importante a las 96 hpf, en todos los grupos de tratamiento.

4.4. Daño oxidativo producido por la guanylurea

Los niveles de LPX, HPx y POx en los embriones de *Danio rerio* expuestos a GUA se muestran en la Fig. 8. Al igual que en las enzimas antioxidantes, los niveles de todos los biomarcadores de daño oxidativo, en todos los grupos de exposición, exhibieron un aumento significativo en comparación con el grupo de control. Además, los niveles de todos los biomarcadores de daño oxidativo aumentaron de manera dependiente de la concentración, alcanzando el pico más alto con una dosis de 75000 µg/L de GUA. De manera similar, los niveles de LPX en todos los grupos de exposición también aumentaron de manera dependiente del tiempo. Sin embargo, en comparación con las 72 hpf, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de HPx y POx a las 96 hpf.

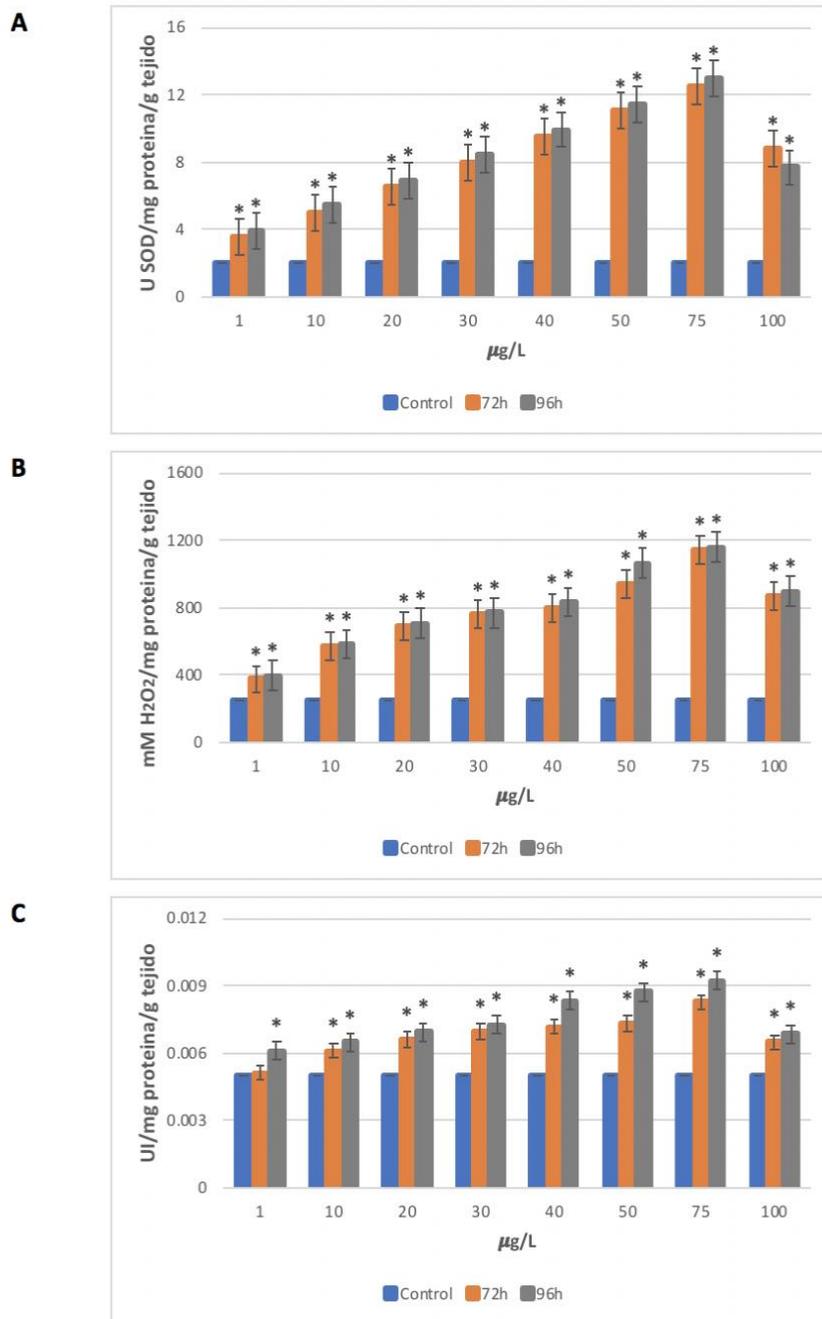


Fig. 5. Actividad de las enzimas antioxidantes, SOD **A**, CAT **B** y GPx **C**, en embriones de *Danio rerio* expuestos a MET a las 72 hpf y 96 hpf. Los datos se expresan como la media de tres repeticiones \pm error estándar (SEM). * indican un cambio significativo con $P < 0.05$.

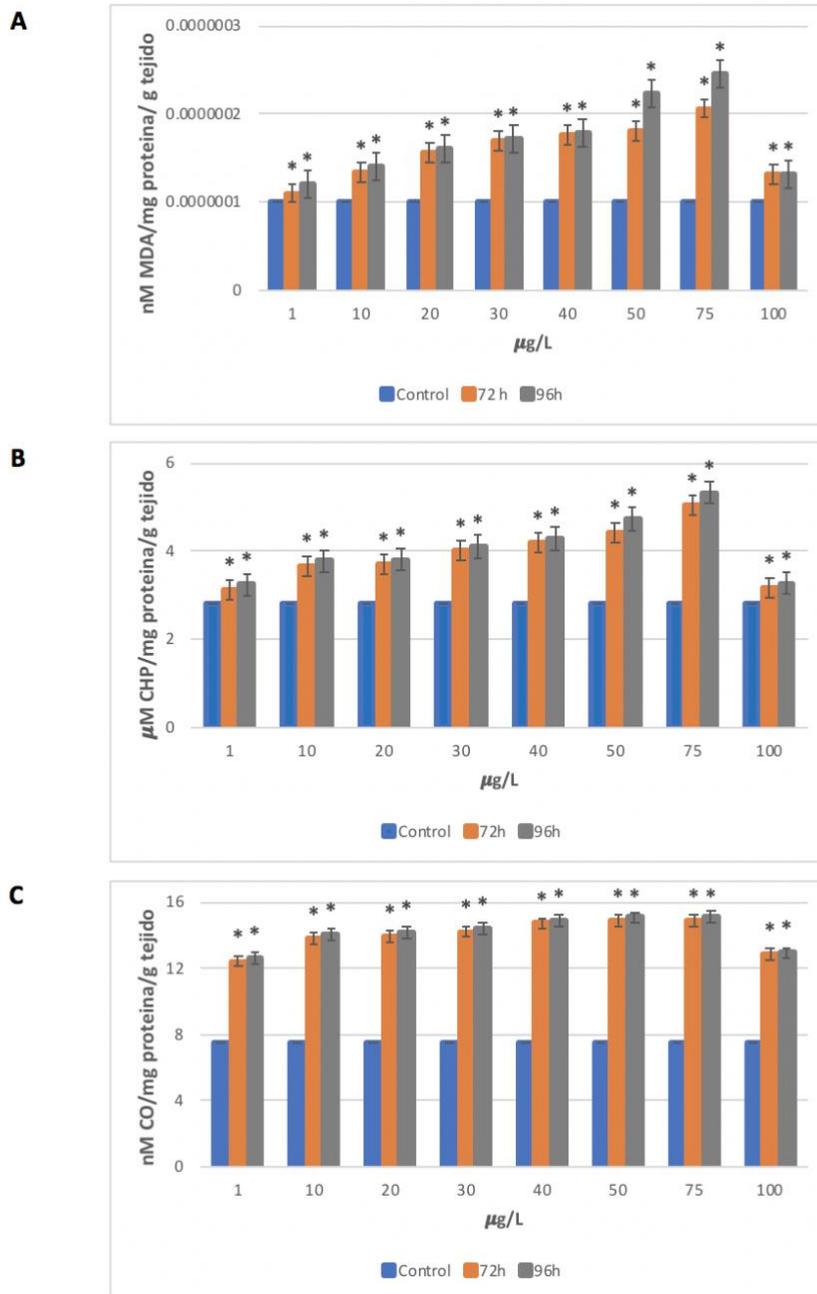


Fig. 6. Niveles de LPX **A**, HPx **B** y POx **C**, en embriones de *Danio rerio* expuestos a MET a las 72 hpf y 96 hpf. Los datos se expresan como la media de tres repeticiones \pm error estándar (SEM). * indican un cambio significativo con $P < 0.05$.

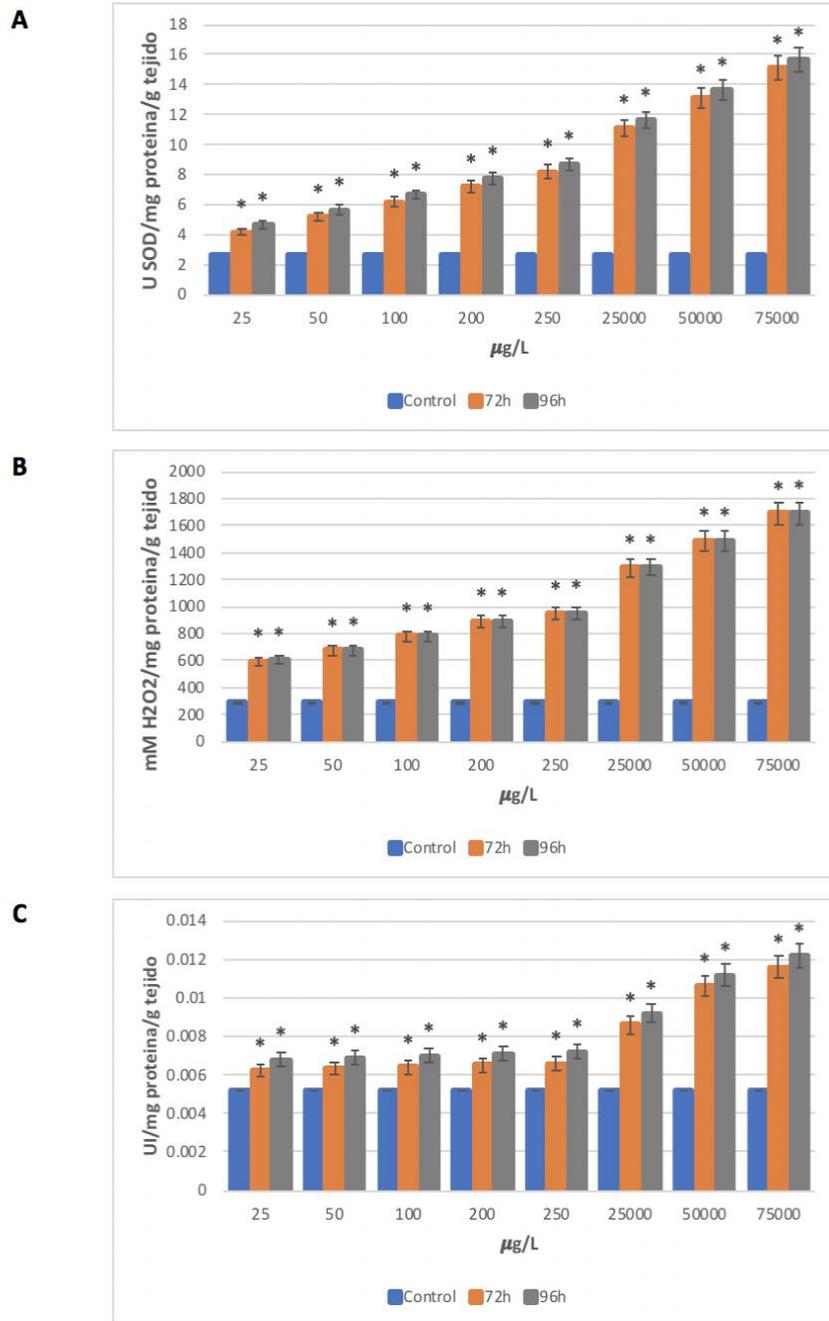


Fig. 7. Actividad de las enzimas antioxidantes, SOD **A**, CAT **B** y GPx **C**, en embriones de *Danio rerio* expuestos a GUA a las 72 hpf y 96 hpf. Los datos se expresan como la media de tres repeticiones \pm error estándar (SEM). * indican un cambio significativo con $P < 0.05$.

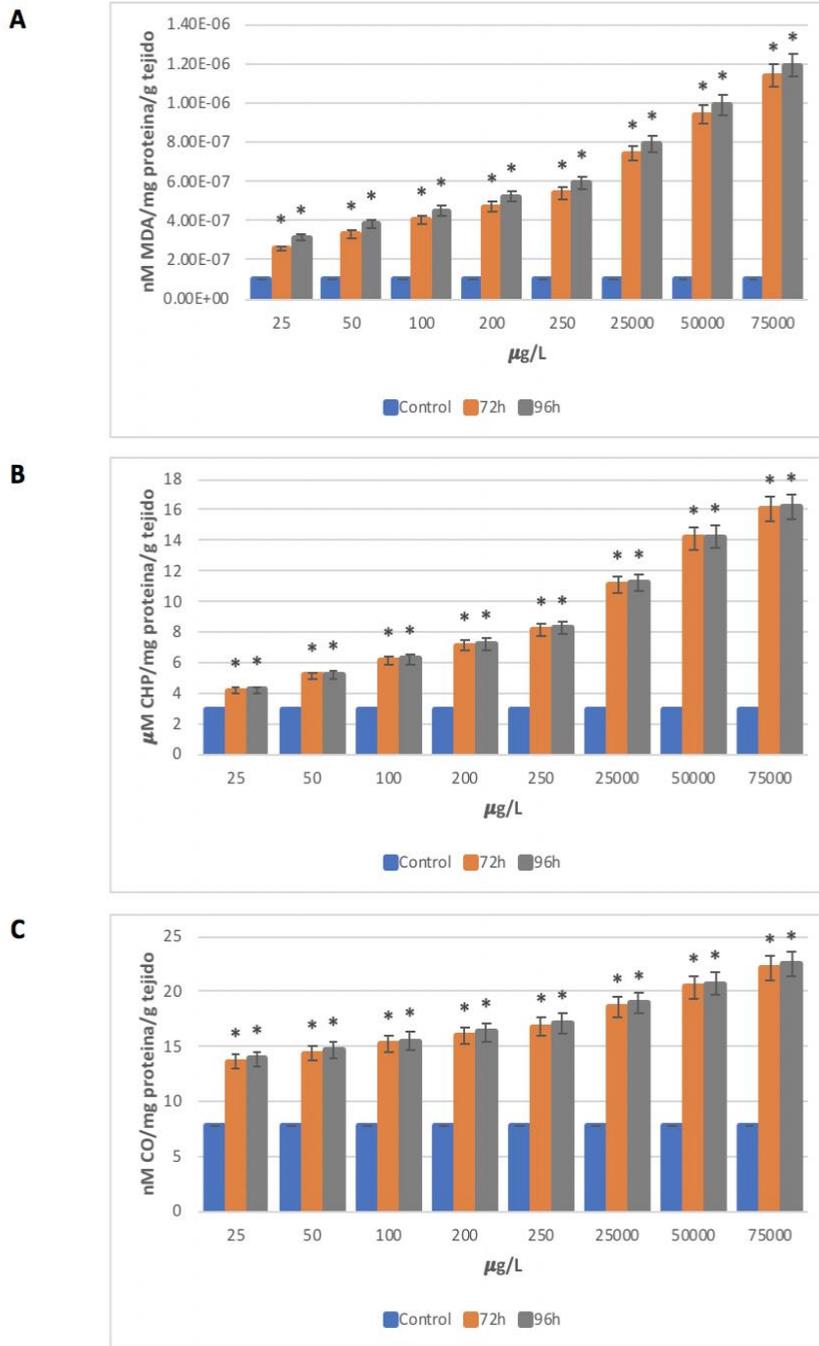


Fig. 8. Niveles de LPX **A**, HPx **B** y POx **C**, en embriones de *Danio rerio* expuestos a GUA a las 72 hpf y 96 hpf. Los datos se expresan como la media de tres repeticiones \pm error estándar (SEM). * indican un cambio significativo con $P < 0.05$.

5. IBR

5.1. Metformina

Los valores de IBR aumentaron a medida que las concentraciones de MET aumentaban, lo que indica que las altas concentraciones de este fármaco indujeron efectos más pronunciados en los embriones, con la excepción de la concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ (Fig. 9). Estos efectos se centraron principalmente en el daño oxidativo, ya que el gráfico de estrellas se desvió principalmente a estos biomarcadores. En la concentración más baja, por ejemplo, el biomarcador de daño oxidativo que más afectó a los embriones fue POx. No obstante, a medida que aumentaban las concentraciones, los biomarcadores HPx y LPx tenían más influencia sobre el embrión. En cuanto al tiempo de exposición, las concentraciones de 50 $\mu\text{g/L}$ y 75 $\mu\text{g/L}$ mostraron un aumento significativo en los valores medios de IBR.

5.2. Guanylurea

Los valores de IBR aumentaron de una manera dependiente de la concentración, lo que indica que altas concentraciones de este producto de degradación indujeron más efectos de estrés oxidativo en los embriones (Fig. 10). Estos efectos se centraron principalmente en el daño oxidativo, ya que el gráfico de estrellas se desvió principalmente a estos biomarcadores. En la concentración más baja, por ejemplo, el biomarcador de daño oxidativo que más afectó a los embriones fue la POx. No obstante, a medida que aumentaban las concentraciones, los biomarcadores HPx y LPx tenían más influencia sobre el embrión. En cuanto al tiempo de exposición, ninguna concentración mostró un aumento significativo en los valores medios de IBR en comparación con las 72 hpf.



Fig. 9. Valores de IBR y gráficos en estrella de la respuesta al estrés oxidativo de los embriones de *Danio rerio* expuestos a MET. Los biomarcadores de cada grupo de tratamiento (líneas de colores) se compararon con los del grupo de control (línea discontinua). El área por encima de cero indica la producción del biomarcador y por debajo de cero refleja la reducción del biomarcador. Las letras (A-H) representan cada una de las concentraciones de MET probadas en este estudio, ordenadas de menor a mayor.



Fig. 10. Valores de IBR y gráficos en estrella de la respuesta al estrés oxidativo de los embriones de *Danio rerio* expuestos a GUA. Los biomarcadores de cada grupo de tratamiento (líneas de colores) se compararon con los del grupo de control (línea discontinua). El área por encima de cero indica la producción del biomarcador y por debajo de cero refleja la reducción del biomarcador. Las letras (A-H) representan cada una de las concentraciones de GUA probadas en este estudio, ordenadas de menor a mayor.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se investigaron los efectos nocivos del fármaco antidiabético MET y de su principal producto de degradación GUA sobre el desarrollo embrionario de *Danio rerio*. Nuestros resultados demostraron que las concentraciones ambientalmente relevantes de MET y GUA pueden aumentar la tasa de mortalidad y malformaciones en los embriones de pez cebra. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los encontrados por Jacob et al., 2018, quienes señalaron que concentraciones de MET de 1 $\mu\text{g/L}$ a 1000 $\mu\text{g/L}$ no afectaron la tasa de mortalidad de los embriones de trucha marrón. Además, Jacob et al., 2019 establecieron que 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$ de GUA no inducían ningún efecto letal en larvas y juveniles de trucha marrón. Las diferencias entre los estudios pueden explicarse debido a las diferentes temperaturas de incubación. Los embriones de trucha marrón, por ejemplo, se incubaron a 7°C y 11°C, mientras que los embriones de pez cebra se mantuvieron en cámaras climáticas a 27°C. Esto es digno de mención, ya que Jacob et al., 2018 encontraron concentraciones más altas de la MET en embriones de trucha marrón expuestos a 11°C en comparación con la temperatura más baja. Por tanto, se sugiere que la temperatura puede mejorar la absorción de este fármaco. Otro factor que puede influir en los resultados de ambos estudios son las diferencias en las etapas de desarrollo embrionario. Por ejemplo, en nuestro estudio, los embriones de pez cebra expuestos a MET se encontraban en la etapa de esfera (4 hpf), mientras que los embriones de trucha marrón expuestos a esta droga estaban en la etapa de ojos (48 dpf). Es bien sabido que a medida que pasa el tiempo la estructura del corion cambia y la dureza de la membrana embrionaria comienza a elevarse, lo que conduce a una baja permeabilidad. Ussery et al., 2018, por ejemplo, demostraron que los embriones Medaka japoneses expuestos a 10 $\mu\text{g/L}$ de 14C-MET antes del endurecimiento (<6 hpf) tenían

significativamente más 14C-MET en comparación con los embriones expuestos a este compuesto después del endurecimiento del corion (24 hpf). Dado que el desarrollo embrionario de la medaka japonesa y el pez cebra son comparables (Furutani-Seikia y Wittbrod, 2004), sugerimos que la MET tuvo un comportamiento de absorción similar en el pez cebra. Por lo tanto, MET podría ser absorbido fácilmente por el pez cebra en la etapa de esfera, pero no en la trucha marrón en la etapa de ojos, lo que lleva a una respuesta tóxica diferente, siendo esta última más severa en el pez cebra. En general, las propiedades químicas y la estructura de la GUA son similares a las de la metformina (Scheurer et al., 2012), lo que podría indicar un comportamiento ambiental comparable y respuestas tóxicas paralelas (Escher y Fenner, 2011). Aunque hay escasez de información sobre la toxicidad de la GUA, y no se sabe si este TP actúa de manera similar a la MET, Ussery et al., 2019 describieron efectos tóxicos comparables en el desarrollo de la Medaka japonesa para ambos compuestos. Sin embargo, las concentraciones de GUA que indujeron efectos en los peces fueron inferiores a las del MET. Esto es importante de mencionar, ya que la facilidad que presenta la MET de ser absorbida por los embriones antes del endurecimiento del corion puede que también la presente la GUA.

Curiosamente, la MET y la GUA no solo aumentaron la tasa de mortalidad y malformaciones en los embriones de pez cebra, sino que también alteraron el proceso de eclosión en los peces. En el caso de los embriones expuestos a MET se observó un proceso de eclosión anticipada, mientras que en los embriones expuesto a GUA se observó un retraso en la eclosión. Estos hallazgos son consistentes con los reportados por Flores et al., 2020, quienes demostraron que la MET indujo una eclosión anticipada (48hpf) en los embriones de pez cebra expuestos a varias concentraciones (10µg / L - 2000000µg / L) de este fármaco. De manera análoga, en

un estudio comparativo aleatorizado, Rowan et al., 2008 mostraron que las tasas de partos prematuros espontáneos y iatrogénicos eran más altas en las mujeres tratadas con metformina que en las que recibían insulina. La eclosión anticipada de los peces o bien el retardo en la eclosión son importantes, ya que los peces eclosionados/no eclosionados son más vulnerables a los depredadores, el estrés mecánico y osmótico y los agentes tóxicos presentes en los cuerpos de agua, lo que provoca alteraciones más graves en su desarrollo. Las alteraciones de la eclosión en peces pueden ser inducidas por varios factores endógenos y exógenos, incluidos agentes tóxicos, disponibilidad de oxígeno, moduladores químicos del sistema nervioso central, liberación de enzimas proteolíticas y niveles hormonales (De la Paz et al., 2017). No obstante, los mecanismos y vías implicados no se han dilucidado por completo. Dado que estudios anteriores han demostrado que la MET puede ser un disruptor endocrino (Niemuth y Kapler, 2015; Lee, 2017; Monshi, 2017; Niemuth et al., 2018; Lee et al., 2019), se puede sugerir que las alteraciones hormonales en los peces podrían estar involucradas en el proceso de eclosión acelerada. Además, como la MET y la GUA han mostrado efectos similares antes, este podría ser el mecanismo por el cual la GUA también alteran el proceso de eclosión. No obstante, se necesitan más estudios, primero para investigar si este TP puede alterar los niveles hormonales y, segundo, si esta alteración está relacionada con el proceso de eclosión.

Durante todo el período de exposición, la MET y la GUA indujeron varias malformaciones en los embriones de pez cebra. Entre estas, se incluye la malformación de cola, escoliosis, edema pericárdico, deformación del saco vitelino, hipo pigmentación, ausencia de aletas, ausencia de ojos y malformación craneofacial. De acuerdo con estos resultados, un estudio realizado en embriones de pollo mostró que múltiples concentraciones (0,1 mg / ml - 5 mg / ml) de MET mostraban un retraso en el cierre de los neuroporos anteriores y posteriores, lo

que provocaba anomalías cerebrales, ausencia de yemas en las extremidades, así como un retraso en la formación de ojos, otoquistes, corazón, branquias y somitas (Siripattanaphol et al., 2020). Además, Flores et al., 2020 señalaron que la MET puede causar microcefalia y disminución de la longitud de la cola en embriones de pez cebra expuestos a múltiples concentraciones ($10\mu\text{g} / \text{L}$ - $2000000\mu\text{g} / \text{L}$) de este fármaco. Con respecto a la GUA, en un estudio más reciente, Ussery et al., 2021 demostraron que este TP desregulaba el receptor 1b de rianodina del músculo esquelético (Ryr1) y dos poliamidas importantes putrescina y O-fosfocolamina en larvas de Medaka japonesas. Esto es de suma importancia ya que la O-fosfocolamina participa en las vías de señalización celular que regulan la proliferación, diferenciación, necrosis y apoptosis celular, así como en la respuesta al estrés oxidativo (Toda et al., 2017; Bridges et al., 2018). Por lo tanto, se sugiere que la desregulación de estas vías de señalización puede conducir a anomalías en el desarrollo.

Hoy en día se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ROS) regulan factores de transcripción clave que a su vez regulan diferentes cascadas de señalización celular implicadas en la proliferación, diferenciación y apoptosis (Pašková et al., 2011). Sin embargo, luego de una exposición a cualquier compuesto tóxico, el equilibrio entre ROS y enzimas antioxidantes se ve afectado y puede ocurrir daño oxidativo en el organismo (Nita y Grzybowski, 2016). En consecuencia, el daño oxidativo puede deteriorar el ADN y promover la apoptosis celular, afectando la integridad del organismo (Rai et al., 2015; Kreuz y Fischel, 2016). Aquí, demostramos que después de una exposición aguda a MET y GUA en las primeras etapas de la vida del pez cebra, ambos compuestos puede inducir una respuesta de estrés oxidativo en los embriones. Además, nuestros análisis de IBR indicaron que a medida que aumentaban las concentraciones de MET y GUA, también aumentaban los valores

medios de IBR. Por lo tanto, las respuestas al estrés oxidativo en los organismos fueron más pronunciadas a medida que aumentaba la concentración. De acuerdo con nuestros resultados, Ussery et al., 2021 indicaron que 1 ng/L de GUA puede alterar varias vías involucradas en la salud general de los embriones de Medaka japoneses, incluida la desintoxicación de ROS, entre otras. Además, la MET también se ha asociado con una mayor producción de ROS. Anedda et al., 2008, por ejemplo, indicaron que la MET aumentó los niveles de ROS en las células 3T3-L1. De manera análoga, Queiroz et al., 2014 demostraron que la MET indujo la detención del ciclo celular y aumentó la apoptosis celular en células MCF-7 tratadas con 10 mM de este fármaco. Además, explicaron que estas respuestas estaban mediadas por el estrés oxidativo y que un tratamiento con SOD y CAT mejoró la viabilidad celular. Finalmente, en un estudio más reciente, Lee et al., 2019 evaluaron la toxicidad acuática de la MET bajo un régimen de exposición multigeneracional y encontraron que este fármaco aumentó el contenido de ROS y disminuyó la actividad de GSH en peces F0. Además, la actividad de CAT también aumentó significativamente con el tratamiento de MET, lo que sugiere que las concentraciones ambientalmente relevantes de este contaminante pueden causar estrés oxidativo en *Oryzias latipes*.

En cuanto al mecanismo de acción de la MET, este fármaco puede inhibir el complejo I de la cadena de transporte de electrones (ETC) mitocondrial, provocando diferentes cambios en la membrana mitocondrial y la producción de ATP (Andrzejewski et al., 2014; Cameron et al., 2018). Las mitocondrias son una fuente importante de ROS y, como mencionamos anteriormente, estas ROS son importantes en la señalización redox dentro de las células. No obstante, las ROS también pueden contribuir a inducir daño oxidativo a las mitocondrias, afectando su capacidad para sintetizar ATP y para llevar a cabo sus funciones metabólicas (Adam-Vizi y Chinopoulos, 2006). Las mutaciones del ADN mitocondrial pueden alterar los

elementos de la cadena respiratoria o los ARN ribosomales y de transferencia necesarios para la expresión del gen mitocondrial, lo que da lugar a varias enfermedades (Tuppen et al., 2010). Además, la acumulación de mitocondrias disfuncionales puede aumentar los efectos dañinos de los inhibidores del complejo I de la cadena de transporte de electrones (ETC) sobre la supervivencia celular (Espada et al., 2020). Aunque ningún estudio ha demostrado que la GUA pueda inhibir el complejo I del ETC mitocondrial, estudios recientes han demostrado que la GUA ejerce efectos sobre los peces ELS de manera similar a la MET (Ussery et al., 2021). Por lo tanto, sugerimos que las anomalías corporales encontradas en este estudio pueden ser una consecuencia de la inhibición del complejo I del ETC mitocondrial. Complementando lo anterior, un estudio reciente investigó los efectos tóxicos que los fármacos inhibidores mitocondriales inducían en embriones de pez cebra. En sus resultados señalaron que diferentes concentraciones (0,3 nM - 10 mM) de inhibidores del complejo I y II indujeron varias anomalías del desarrollo en los embriones de pez cebra. Estas malformaciones incluyeron edema, defectos en los ojos, la cabeza y el esqueleto, hipo pigmentación, detención de la gástrula, necrosis del saco vitelino y sangrado (Pinho et al., 2013).

Hay dos mecanismos por los cuales las mitocondrias aumentan la producción de superóxido. En el primero, la reserva de NADH disminuye, por ejemplo, por una interrupción en la cadena respiratoria, una baja demanda de ATP y/o una pérdida de citocromo c por apoptosis. Esto conduce a la formación de superóxido, en el mono nucleótido de flavina (FMN), en una tasa que depende de la relación $NADH / NAD +$ (Kushnareva et al., 2002; Liu et al., 2002; Kussmaul y Hirst, 2006). En el segundo, hay una falta de producción de ATP, una fuerza protonmotriz alta y una coenzima Q reducida, lo que conduce a un transporte de electrones inverso a través del complejo I, que produce una cantidad importante de superóxido (St-

Pierre et al., 2002; Liu et al., 2002). Hasta ahora, se cree que la inhibición del complejo mitocondrial I por la MET puede interrumpir el flujo de electrones y causar la generación de superóxido por una reducción de FMN (Lee et al., 2019). No obstante, se necesitan más estudios para comprender mejor el mecanismo por el cual este fármaco aumenta la producción de superóxido en las mitocondrias. Además, los estudios futuros también deberían dilucidar si este mecanismo podría ser similar en la GUA.

En concentraciones bajas ($1\mu\text{g/L}$ - $75\mu\text{g/L}$), la MET aumentó la mortalidad, la gravedad de las malformaciones, la tasa de eclosión y los biomarcadores de estrés oxidativo de una manera dependiente de la concentración. No obstante, a una concentración de $100\mu\text{g/L}$, todos los criterios de valoración evaluados en este trabajo se redujeron significativamente con respecto a los otros grupos de tratamiento. Curiosamente, este no es el primer estudio que encuentra estas variaciones en concentraciones más altas de este fármaco. Jacob et al., 2018, por ejemplo, demostraron que la cantidad de glucógeno hepático aumentó en embriones de trucha marrón expuestos a MET. No obstante, este aumento fue específicamente mayor en los peces expuestos a la dosis más baja de MET. Mientras tanto, en dosis más altas, el contenido de glucógeno en el hígado mostró una gran inconsistencia. De manera similar, Flores et al., 2020 señalaron que a la mayor concentración de MET, el 100% de los embriones mostraron una eclosión anticipada. Sin embargo, a la misma concentración, la MET concibió un 0% de teratogenicidad. Por lo tanto, sugerimos que la MET podría experimentar una dosis-respuesta bifásica. La hormesis es un fenómeno de respuesta a la dosis, caracterizado por una respuesta a una dosis baja que tiene un efecto opuesto al observado en dosis altas (Ray et al., 2014). Además, esto es altamente

generalizable, ya que es independiente del modelo biológico, el punto final medido, la clase química y la variabilidad interindividual (Calabrese y Mattson, 2017).

CONCLUSIÓN

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que proporciona evidencia de daño oxidativo en embriones de peces expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de GUA. Dado que el daño oxidativo puede causar daño directo al ADN y apoptosis celular, creemos que esto puede estar involucrado en la generación de las malformaciones corporales encontradas en este estudio. Además, como la MET inhiben el complejo mitocondrial I y Ussery et al., 2021 demostraron que la MET y la GUA tienen un mecanismo de acción similar, se podría sugerir que el daño oxidativo inducido por ambos compuestos está relacionado con la inhibición del complejo mitocondrial I. Estudios futuros deben dilucidar si el aumento de la producción de ROS en ambos compuestos está relacionado con la inhibición del complejo mitocondrial I y /o si están involucrados otros mecanismos. Además, dado que actualmente existe una gran laguna de conocimiento sobre la toxicidad de estos compuestos, se necesitan más estudios para comprender mejor el impacto ambiental de este fármaco y su producto de TP.

REFERENCIAS

- Adam-Vizi, V., & Chinopoulos, C. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in pharmacological sciences*, 27(12), 639-645.
- Ali, A. M., Rønning, H. T., Alarif, W., Kallenborn, R., & Al-Lihaibi, S. S. (2017). Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in effluent-dominated Saudi Arabian coastal waters of the Red Sea. *Chemosphere*, 175, 505-513.
- Andrzejewski, S., Gravel, S. P., Pollak, M., & St-Pierre, J. (2014). Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & metabolism*, 2(1), 1-14.
- Anedda, A., Rial, E., & González-Barroso, M. M. (2008). Metformin induces oxidative stress in white adipocytes and raises uncoupling protein 2 levels. *Journal of Endocrinology*, 199(1), 33-40.
- Althakafy, J. T., Kulsing, C., Grace, M. R., & Marriott, P. J. (2018). Determination of selected emerging contaminants in freshwater invertebrates using a universal extraction technique and liquid chromatography accurate mass spectrometry. *Journal of separation science*, 41(19), 3706-3715.
- Asghar, M. A., Zhu, Q., Sun, S., & Shuai, Q. (2018). Suspect screening and target quantification of human pharmaceutical residues in the surface water of Wuhan, China, using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Science of The Total Environment*, 635, 828-837.
- Bahrambeigi, S., & Shafiei-Irannejad, V. (2020). Immune-mediated anti-tumor effects of metformin; targeting metabolic reprogramming of T cells as a new possible mechanism for anti-cancer effects of metformin. *Biochemical pharmacology*, 174, 113787.
- Beliaeff, B., Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316-1322.

Bradley, P. M., Journey, C. A., Button, D. T., Carlisle, D. M., Clark, J. M., Mahler, B. J., ... & VanMetre, P. C. (2016). Metformin and other pharmaceuticals widespread in wadeable streams of the southeastern United States. *Environmental Science & Technology Letters*, 3(6), 243-249.

Bradley, P. M., Journey, C. A., Romanok, K. M., Barber, L. B., Buxton, H. T., Foreman, W. T., ... & Jones, D. K. (2017). Expanded target-chemical analysis reveals extensive mixed-organic-contaminant exposure in US streams. *Environmental science & technology*, 51(9), 4792-4802.

Buege J.A.y Aust S.D. (1979). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310.

Calabrese, E. J., & Mattson, M. P. (2017). How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?. *NPJ aging and mechanisms of disease*, 3(1), 1-8.

Cameron, A. R., Logie, L., Patel, K., Erhardt, S., Bacon, S., Middleton, P., ... & Rena, G. (2018). Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox Biology*, 14, 187-197.

Chau, H. T. C., Kadokami, K., Duong, H. T., Kong, L., Nguyen, T. T., Nguyen, T. Q., & Ito, Y. (2018). Occurrence of 1153 organic micropollutants in the aquatic environment of Vietnam. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7147-7156.

Chiarello, M., Minetto, L., Della Giustina, S. V., Beal, L. L., & Moura, S. (2016). Popular pharmaceutical residues in hospital wastewater: quantification and qualification of degradation products by mass spectroscopy after treatment with membrane bioreactor. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(16), 16079-16089

- Crago, J., Bui, C., Grewal, S., & Schlenk, D. (2016). Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin. *General and comparative endocrinology*, 232, 185-190.
- Cui, H., & Schröder, P. (2016). Uptake, translocation and possible biodegradation of the antidiabetic agent metformin by hydroponically grown *Typha latifolia*. *Journal of hazardous materials*, 308, 355-361.
- Cummings, B. M., Needoba, J. A., & Peterson, T. D. (2018). Effect of metformin exposure on growth and photosynthetic performance in the unicellular freshwater chlorophyte, *Chlorella vulgaris*. *PloS one*, 13(11), e0207041.
- de Jesus Gaffney, V., Cardoso, V. V., Cardoso, E., Teixeira, A. P., Martins, J., Benoliel, M. J., & Almeida, C. M. M. (2017). Occurrence and behaviour of pharmaceutical compounds in a Portuguese wastewater treatment plant: Removal efficiency through conventional treatment processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(17), 14717-14734.
- De la Paz, J. F., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M. S., & Allende, M. L. (2017). Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 710.
- De Solla, S. R., Gilroy, E. A., Klinck, J. S., King, L. E., McInnis, R., Struger, J., ... & Gillis, P. L. (2016). Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care products in the unionid mussel *Lasmigona costata* in a river receiving wastewater effluent. *Chemosphere*, 146, 486-496.
- Eggen, T., & Lillo, C. (2012). Antidiabetic II drug metformin in plants: uptake and translocation to edible parts of cereals, oily seeds, beans, tomato, squash, carrots, and potatoes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(28), 6929-6935.

- Elizalde-Velázquez, G. A., & Gómez-Oliván, L. M. (2020). Occurrence, toxic effects and removal of metformin in the aquatic environments in the world: Recent trends and perspectives. *Science of The Total Environment*, 702, 134924.
- Elliott, S. M., & VanderMeulen, D. D. (2017). A regional assessment of chemicals of concern in surface waters of four Midwestern United States national parks. *Science of the Total Environment*, 579, 1726-1735.
- Estrada-Arriaga, E. B., Cortés-Muñoz, J. E., González-Herrera, A., Calderón-Mólgora, C. G., de Lourdes Rivera-Huerta, M., Ramírez-Camperos, E., ... & Martín-Domínguez, A. (2016). Assessment of full-scale biological nutrient removal systems upgraded with physico-chemical processes for the removal of emerging pollutants present in wastewaters from Mexico. *Science of the Total Environment*, 571, 1172-1182.
- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology*, 76(2), 122-159.
- Flores, E. L., Lapuz, B. L., Navarrete, I., & Hallare, A. (2020). Comparative toxicological analysis of metformin (Biguanide) and glibenclamide (Sulfonylureas), using zebrafish embryotoxicity test (ZFET). *Philippine Journal of Health Research and Development*, 24(1), 52-63.
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., & Viollet, B. (2014). Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell metabolism*, 20(6), 953-966.
- Furutani-Seiki, M., & Wittbrodt, J. (2004). Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mechanisms of development*, 121(7-8), 629-637.
- García-García, G., Reyes-Carrillo, G. I., Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2017). Population level responses of rotifers (*Brachionus calyciflorus* and *Plationus patulus*) to the anti-diabetic drug, metformin. *Journal of Environmental Biology*, 38(6), 1213-1219.

- Gago-Ferrero, P., Borova, V., Dasenaki, M. E., & Thomaidis, N. S. (2015). Simultaneous determination of 148 pharmaceuticals and illicit drugs in sewage sludge based on ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(15), 4287-4297.
- Ghoshdastidar, A. J., Fox, S., & Tong, A. Z. (2015). The presence of the top prescribed pharmaceuticals in treated sewage effluents and receiving waters in Southwest Nova Scotia, Canada. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 689-700.
- Godoy, A. A., Domingues, I., Nogueira, A. J. A., & Kummrow, F. (2018). Ecotoxicological effects, water quality standards and risk assessment for the anti-diabetic metformin. *Environmental Pollution*, 243, 534-542.
- Gordon, J. (2018). The Effects of Urban Contaminants on Neutrophils of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*).
- Guan, Y., Wang, D., Bu, H., Zhao, T., & Wang, H. (2020). The Effect of Metformin on Polycystic Ovary Syndrome in Overweight Women: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *International journal of endocrinology*, 2020.
- Guzel, E. Y., Cevik, F., & Daglioglu, N. (2018). Determination of pharmaceutical active compounds in Ceyhan River, Turkey: Seasonal, spatial variations and environmental risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 1-16.
- Huber, S., Remberger, M., Kaj, L., Schlabach, M., Jörundsdóttir, H. Ó., Vester, J., ... & Dam, M. (2016). A first screening and risk assessment of pharmaceuticals and additives in personal care products in waste water, sludge, recipient water and sediment from Faroe Islands, Iceland and Greenland. *Science of the Total Environment*, 562, 13-25.
- Jacob, S., Dötsch, A., Knoll, S., Köhler, H. R., Rogall, E., Stoll, D., ... & Triebkorn,

- R. (2018). Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)?. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 48.
- Jacob, S., Köhler, H. R., Tisler, S., Zwiener, C., & Triebkorn, R. (2019). Impact of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylurea on the health of the big ramshorn snail (*Planorbis corneus*). *Frontiers in Environmental Science*, 7, 45.
- Jeong, T. Y., Yuk, M. S., Jeon, J., & Kim, S. D. (2016). Multigenerational effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on the individual fitness and population growth of *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*, 569, 1553-1560.
- Jiang, Z., Hunt, J., Wolff, S. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202(2), 384–389.
- Johnson, C. (2018). The Effects of Acute Urban Mixture Exposure on the T cells of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*).
- Kimmel C.B., Ballars W.W., Kimmel S.R., Ullmann B. y Schilling T.F. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203, 253-310.
- Kleywegt, S., Payne, M., Ng, F., & Fletcher, T. (2019). Environmental loadings of Active Pharmaceutical Ingredients from manufacturing facilities in Canada. *Science of The Total Environment*, 646, 257-264.
- Koagouw, W., & Ciocan, C. (2018). Impact of Metformin and Increased Temperature on Blue Mussels *Mytilus edulis*-Evidence for Synergism. *Journal of shellfish research*, 37(3), 467-475.
- Kong, L., Kadokami, K., Wang, S., Duong, H. T., & Chau, H. T. C. (2015). Monitoring of 1300 organic micro-pollutants in surface waters from Tianjin, North China. *Chemosphere*, 122, 125-130

Kong, L., Kadokami, K., Duong, H. T., & Chau, H. T. C. (2016). Screening of 1300 organic micro-pollutants in groundwater from Beijing and Tianjin, North China. *Chemosphere*, 165, 221-230.

Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2015). Comprehensive study of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylurea in Greek wastewaters. *Water research*, 70, 436-448.

Kot-Wasik, A., Jakimska, A., & Śliwka-Kaszyńska, M. (2016). Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants. *Environmental monitoring and assessment*, 188(12), 661.

Kushnareva, Y., Murphy, A. N., & Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD (P)⁺ oxidation–reduction state. *Biochemical Journal*, 368(2), 545-553.

Kussmaul, L., & Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(20), 7607-7612.

Le Doujet, T. (2016). Uptake, organ distribution and physiological effects of an anti-diabetic II drug (metformin) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Master's thesis, NTNU).

Lee, J. W., Lee, J. W., Shin, Y. J., Kim, J. E., Ryu, T. K., Ryu, J., ... & Park, K. (2017). Multi-generational xenoestrogenic effects of Perfluoroalkyl acids (PFAAs) mixture on *Oryzias latipes* using a flow-through exposure system. *Chemosphere*, 169, 212-223.

- Lee, J. W., Shin, Y. J., Kim, H., Kim, H., Kim, J., Min, S. A., ... & Park, K. (2019). Metformin-induced endocrine disruption and oxidative stress of *Oryzias latipes* on two-generational condition. *Journal of hazardous materials*, 367, 171-181.
- Lesser, L. E., Mora, A., Moreau, C., Mahlknecht, J., Hernández-Antonio, A., Ramírez, A. I., & Barrios-Piña, H. (2018). Survey of 218 organic contaminants in groundwater derived from the world's largest untreated wastewater irrigation system: Mezquital Valley, Mexico. *Chemosphere*, 198, 510-521.
- Levine, R., Williams, J., Stadtman, E., Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 346–357.
- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*, 80(5), 780-787.;
- Luja-Mondragón, M., Gómez-Oliván, L. M., SanJuan-Reyes, N., Islas-Flores, H., Orozco-Hernández, J. M., Heredia-García, G., ... & Dublán-García, O. (2019). Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes. *Science of The Total Environment*, 660, 751-764.
- MacLaren, R. D., Wisniewski, K., & MacLaren, C. (2018). Environmental concentrations of metformin exposure affect aggressive behavior in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *PloS one*, 13(5), e0197259.
- Markiewicz, M., Jungnickel, C., Stolte, S., Białk-Bielińska, A., Kumirska, J., & Mroziak, W. (2017). Ultimate biodegradability and ecotoxicity of orally administered antidiabetic drugs. *Journal of hazardous materials*, 333, 154-161.
- Mayoudom, E. V. T., Nguidjoe, E., Mballa, R. N., Tankoua, O. F., Fokunang, C., Anyakora, C., & Blackett, K. N. (2018). Identification and quantification of 19 pharmaceutical active

compounds and metabolites in hospital wastewater in Cameroon using LC/QQQ and LC/Q-TOF. *Environmental monitoring and assessment*, 190(12), 723.

Meador, J. P., Yeh, A., Young, G., & Gallagher, E. P. (2016). Contaminants of emerging concern in a large temperate estuary. *Environmental pollution*, 213, 254-267.

Meador, J. P., Yeh, A., & Gallagher, E. P. (2017). Determining potential adverse effects in marine fish exposed to pharmaceuticals and personal care products with the fish plasma model and whole-body tissue concentrations. *Environmental Pollution*, 230, 1018-1029.

Meador, J. P., Yeh, A., & Gallagher, E. P. (2018). Adverse metabolic effects in fish exposed to contaminants of emerging concern in the field and laboratory. *Environmental pollution*, 236, 850-861.

Melvin, S. D., Habener, L. J., Leusch, F. D., & Carroll, A. R. (2017). ¹H NMR-based metabolomics reveals sub-lethal toxicity of a mixture of diabetic and lipid-regulating pharmaceuticals on amphibian larvae. *Aquatic toxicology*, 184, 123-132.

Misra y Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. 247, 3170-3175.

Moldovan, Z., Marincas, O., Povar, I., Lupascu, T., Longree, P., Rota, J. S., ... & Alder, A. C. (2018). Environmental exposure of anthropogenic micropollutants in the Prut River at the Romanian-Moldavian border: a snapshot in the lower Danube river basin. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(31), 31040-31050.

Monshi, M. (2017). "Endocrine-Disrupting Properties Of Pharmaceuticals And Personal Care Products (ppcps): An Evaluation Using Aquatic Model Organisms". *Wayne State University Theses*. 578.

- Niemuth, N. J., & Klaper, R. D. (2015). Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere*, *135*, 38-45.
- Niemuth, N. J., Jordan, R., Crago, J., Blanksma, C., Johnson, R., & Klaper, R. D. (2015). Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environmental toxicology and chemistry*, *34*(2), 291-296.
- Niemuth, N. J., & Klaper, R. D. (2018). Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. *Aquatic Toxicology*, *195*, 33-40.
- Nguyen, K. H. (2018). Analysis of emerging environmental contaminations using advanced instrumental tools: application to human and environmental exposure (Doctoral dissertation, University of Birmingham).
- Oliveira, T. S., Murphy, M., Mendola, N., Wong, V., Carlson, D., & Waring, L. (2015). Characterization of pharmaceuticals and personal care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Science of the total environment*, *518*, 459-478.
- Pašková, V., Hilscherová, K., & Bláha, L. (2011). Teratogenicity and embryotoxicity in aquatic organisms after pesticide exposure and the role of oxidative stress. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 211*, 25-61.
- Pérez-Alvarez, I., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Barceló, D., De Alda, M. L., Solsona, S. P., ... & Galar-Martínez, M. (2018). Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, Mexico, and evaluation of their toxic impact. *Environmental pollution*, *240*, 330-341.
- Pinho, B. R., Santos, M. M., Fonseca-Silva, A., Valentão, P., Andrade, P. B., & Oliveira, J. M. (2013). How mitochondrial dysfunction affects zebrafish development and cardiovascular

function: an in vivo model for testing mitochondria-targeted drugs. *British journal of pharmacology*, 169(5), 1072-1090.

Posselt, M., Jaeger, A., Schaper, J. L., Radke, M., & Benskin, J. P. (2018). Determination of polar organic micropollutants in surface and pore water by high-resolution sampling-direct injection-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 20(12), 1716-1727.

Queiroz, E. A., Puukila, S., Eichler, R., Sampaio, S. C., Forsyth, H. L., Lees, S. J., ... & Khaper, N. (2014). Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells. *PloS one*, 9(5), e98207.

Quintão, F. J. O., Freitas, J. R. L., de Fátima Machado, C., Aquino, S. F., de Queiroz Silva, S., & de Cássia Franco Afonso, R. J. (2016). Characterization of metformin by-products under photolysis, photocatalysis, ozonation and chlorination by high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30(21), 2360- 2368.

Radi R., Turrens J., Chang Y., Bush M., Capro D. y Freeman A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 226, 22028-22034.

Rowan, J. A., Hague, W. M., Gao, W., Battin, M. R., & Moore, M. P. (2008). Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *New England Journal of Medicine*, 358(19), 2003-2015.

Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J. (2013). A novel “integrated biomarker response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2721-2725.

- Shraim, A., Diab, A., Alsuhaime, A., Niazy, E., Metwally, M., Amad, M., ... & Dawoud, A. (2017). Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S719-S729.
- Siripattanaphol, K., Rungruang, T., Plakornkul, V., Viravud, Y., & Roongruangchai, J. (2020, August). Teratogenic Effects of Metformin Hydrochloride. In *Rangsit Graduate Research Conference: RGRC* (Vol. 15, No. 2563), pp. 2706-2712).
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., & Brand, M. D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44784-44790.
- Thomaidi, V. S., Stasinakis, A. S., Borova, V. L., & Thomaidis, N. S. (2016). Assessing the risk associated with the presence of emerging organic contaminants in sludge-amended soil: A country-level analysis. *Science of the Total Environment*, 548, 280-288.
- Tisler, S., & Zwiener, C. (2018). Formation and occurrence of transformation products of metformin in wastewater and surface water. *Science of The Total Environment*, 628, 1121-1129.
- Trautwein, C., Berset, J. D., Wolschke, H., & Kümmerer, K. (2014). Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanylurea in several compartments of the aquatic cycle. *Environment international*, 70, 203-212.
- Tuppen, H. A., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(2), 113-128.
- Ussery, E. (2018). *The ecotoxicological effects of metformin and its metabolite, guanylurea, on Japanese medaka (Oryzias latipes)* (Doctoral dissertation).

- Ussery, E., Bridges, K. N., Pandelides, Z., Kirkwood, A. E., Bonetta, D., Venables, B. J., ... & Holdway, D. (2018). Effects of environmentally relevant metformin exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 205, 58-65.
- Ussery, E., Bridges, K. N., Pandelides, Z., Kirkwood, A. E., Guchardi, J., & Holdway, D. (2019). Developmental and full-life cycle exposures to guanylyurea, and guanylyurea-metformin mixtures results in adverse effects on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental toxicology and chemistry*.
- Ussery, E. J., Nielsen, K. M., Simmons, D., Pandelides, Z., Mansfield, C., & Holdway, D. (2021). An 'omics approach to investigate the growth effects of environmentally relevant concentrations of guanylyurea exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 232, 105761.
- Varga, Z.M. (2011). Aquaculture and husbandry at the zebrafish international resource center. *Methods Cell Biol.* 104, 453-478.
- Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*. 281, 25–36.
- Weissinger, R. H., Blackwell, B. R., Keteles, K., Battaglin, W. A., & Bradley, P. M. (2018). Bioactive contaminants of emerging concern in National Park waters of the northern Colorado Plateau, USA. *Science of The Total Environment*, 636, 910-918.
- Westerfield, M. (2007). *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, 5th ed. University of Oregon press.
- Yao, B., Yan, S., Lian, L., Yang, X., Wan, C., Dong, H., & Song, W. (2018). Occurrence and indicators of pharmaceuticals in Chinese streams: A nationwide study. *Environmental Pollution*, 236, 889-898.

Xing, Y., Yu, Y., & Men, Y. (2018). Emerging investigators series: Occurrence and fate of emerging organic contaminants in wastewater treatment plants with an enhanced nitrification step. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 4(10), 1412-1426.

Yan, J. H., Xiao, Y., Tan, D. Q., Shao, X. T., Zheng, Q. D., Pei, W., ... & Wang, D. G. (2019). Wastewater analysis reveals spatial pattern in consumption of anti-diabetes drug metformin in China. *Chemosphere*.

Yeh, A., Marcinek, D. J., Meador, J. P., & Gallagher, E. P. (2017). Effect of contaminants of emerging concern on liver mitochondrial function in Chinook salmon. *Aquatic toxicology*, 190, 21-31.

Zaidi, S., Gandhi, J., Joshi, G., Smith, N. L., & Khan, S. A. (2019). The anticancer potential of metformin on prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 22(3), 351-361.

ANEXOS

1. Artículo de revisión de metformina

Science of the Total Environment 702 (2020) 134924



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

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



Review

Occurrence, toxic effects and removal of metformin in the aquatic environments in the world: Recent trends and perspectives



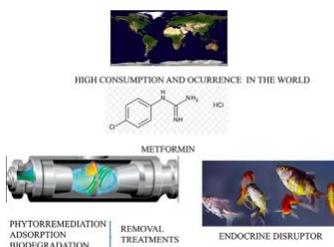
Gustavo Axel Elizalde-Velázquez, Leobardo Manuel Gómez-Oliván*

Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n, Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, Mexico

HIGHLIGHTS

- MET antidiabetic drug review was conducted.
- The annual consumption of MET worldwide is in tons.
- The occurrence of MET in the world ranges from ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$.
- MET toxic effects are embryotoxicity, teratogenicity and endocrine disruption.
- Phytoremediation, adsorption and biodegradation are used to remove MET.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 August 2019
Received in revised form 9 October 2019
Accepted 9 October 2019
Available online 2 November 2019

Editor: Damia Barcelo

Keywords:

Antidiabetics
Occurrence
Consumption
Toxicity
Removal
Metformin

ABSTRACT

Metformin (MET) is the most common drug used to treat type 2 diabetes, but also it is used as an anti-cancer agent and as a treatment for polycystic ovary syndrome. This drug is not metabolized in the human body, and may enter into the environment through different pathways. In wastewater treatments plants (WWTPs), this contaminant is mainly transformed to guanilurea (GUA). However, three further transformation products (TPs): (a) 2,4- diamino-1,3,5-triazine, 4-DAT; (b) 2-amino-4-methylamino-1,3, 5-triazine, 2,4-AMT; and (c) methylbiguanide, MBG; have also been associated with its metabolism. MET, GUA and MBG have been found in WWTPs influents, effluents and surface waters. Furthermore, MET and GUA bioaccumulate in edible plants species, fish and mussels potentially contaminating the human food web. MET is also a potential endocrine disruptor in fish. Phytoremediation, adsorption and biodegradation have shown a high removal efficiency of MET, in laboratory. Nonetheless, these removal methods had less efficiency when tried in WWTPs. Therefore, MET and its TPs are a threat to the human being as well as to our environment. This review comprehensively discuss the (1) pathways of MET to the environment and its life-cycle, (2) occurrence of MET and its transformation products (3) removal, (4) toxic effects and (5) future trends and perspectives of possible methods of elimination in water in order to provide potential options for managing these contaminants.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail addresses: lmgomezo@uaemex.mx, lgolivan74@gmail.com (L.M. Gómez-Oliván).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134924>
0048-9697/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2
2. Pathways to the environment: Life-cycle of metformin	4
3. Occurrence of metformin and its transformation products	4
3.1. Wastewater	4
3.2. Surface water	6
3.3. Groundwater	6
3.4. Drinking water	6
3.5. Sludge	7
4. Removal	7
4.1. Adsorption of MET	7
4.2. Biodegradation of MET	7
4.3. Photodegradation	8
4.4. Phytoremediation	8
4.5. Other methods	8
5. Toxic effects	8
5.1. Bioconcentration and bioaccumulation	8
5.2. Toxicological effects	10
5.2.1. Fish	10
5.2.2. Amphibians	11
5.2.3. Crustaceans	11
5.2.4. Rotifers	11
5.2.5. Mussels	11
5.2.6. Snails	11
5.2.7. Aquatic plant	11
5.2.8. Hydroid	11
5.2.9. Algae	11
6. Conclusions, future trends and perspectives	11
References	12

1. Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disorder that occurs when the body cannot produce enough insulin or cannot use this hormone effectively, leading to consistent hyperglycemia (Chellappan et al., 2018). Currently, over 451 million people worldwide are estimated to have diabetes, and approximately 87% to 91% of all people with diabetes suffer type 2 diabetes (T2D) (Cho et al., 2018).

MET is the first-line oral therapy and the most commonly prescribed oral agent for T2D (Foretz et al., 2014; Rena et al., 2013). It is currently thought to be the highest drug by weight released into the aquatic environment. In the US, prescriptions of MET increased, more than 56% in an eight-year period, from 49.2 million in 2007 to 76.9 million in 2014 (Kleinrock, 2012; Aitken et al., 2015). Similarly, the prescriptions in Netherlands and Western Europe prescriptions also increased by 26% between 2008 and 2012 (ter Laak and Baken, 2014). Furthermore, it is expected that MET consumption steadily increase in the upcoming years, as numerous studies suggest MET usage as an anticancer agent (Mallik and Chowdhury, 2018; Morales and Morris, 2015). Likewise, MET has been also associated with regularization of the menstrual cycle and most hormonal profiles in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) (Yang et al., 2018) which also, may further intensify the global use of MET.

Due to its high consumption, low octanol-water partition coefficient (K_{ow}), and its null metabolism by the human body (Gong et al., 2012). MET is expected to be present worldwide in wastewater treatment plants (WWTPs) effluents, and surface waters. However, during its pass through the WWTPs, MET is biologically transformed to guanilurea (GUA). A bacterial double dealkylation (where both methyl groups are removed at the terminal nitrogen) has been proposed as the main mechanism for the conversion of MET to GUA in WWTPs (Markiewicz et al., 2017a).

Although, some studies have shown a direct correlation between the degradation of MET and the production of GUA. Some

others have shown that GUA concentrations in effluents are significantly lower than MET concentrations in influents (Kosma et al., 2015), but also that GUA concentrations are higher in influents than in effluents (Tisler and Zwiener, 2018). This may be explained by the formation and subsequent degradation of intermediates metabolites. For example, 3 further transformation products (TPs) of MET: a) 2,4- diamino-1,3,5-triazine, 2,4-DAT; b) 2-amin o-4-methylamino-1,3,5-triazine, 2,4-AMT; c) methylbiguanide, MBG) have been detected in WWTPs effluents and in surface waters (Tisler and Zwiener, 2018).

In view of the fact that MET and its TPs are often found at high concentrations in the aquatic environment and can exhibit different toxicities in non-target organisms, a timely review seems appropriate. The aim of this work was to comprehensively investigate the occurrence of MET and its four TPs in influents and effluents of WWTPs, surface water, groundwater and sludge. Additionally, we evaluate and compare treatments involved in the removal of MET and finally, we discuss the toxic effects of

Table 1
Prescriptions of metformin in 2017.

Country	Prescriptions per year	Source
US	81,305,416	MEPS, 2018
England	21,163,271	Prescribing and Medicines Team Health and Social Care Information Centre, 2018.
North	435,432	Mulholland, 2018.
Ireland		
Wales	1,397,814	National Statistics Ystadegau Gwladol, 2018.
Scotland	1,249,597	Information Services Division National Services Scotland, 2018
Denmark	1,589,000	Sundhedsdata-Styrelsen, 2018.
Netherlands	6,146,557	Zorginstituut Nederland, 2018.
Sweden	1,499,590	Socialstyrelsen, 2018.

* prescriptions in 2016

Table 2
Worldwide occurrence of metformin and its transformation products.

Emerging pollutant	Country	Concentrations (µg/L)		Surface Water (min.-max.)	Drinking Water (min.-max.)	Sludge (µg/g) (min.-max.)	Groundwater (min.-max.)	Hospital Effluent (min.-max.)	Source
		WWTP Influent (min.-max.)	WWTP Effluent (min.-max.)						
Metformin	Greenland	n.a	3.58-6.8	0.0331-0.748	n.a	n.a	n.a	n.a	Huber et al., 2016
	Canada	n.a	0.067-10.608	0.012-1.487	n.a	n.a	n.a	n.a	Choshidastidar et al., 2015
USA	n.a-99	n.a	n.a	0.145-10.1	n.a	n.a	n.a	n.a	De Sola et al., 2016
	6306-720	n.a	0.0011-58.9	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Bhar et al., 2015
	n.a	n.a	293-82.7	0.1105-0.832	n.a	n.a	n.a	0.009-630	Orveira et al., 2016
	n.a	n.a	n.a	0.0014-2.635	n.a	n.a	n.a	n.a	Nyberg et al., 2016
	n.a	n.a	n.a	0.0104-4.308	n.a	n.a	n.a	n.a	Bradley et al., 2016
	n.a	n.a	n.a	0.00239-0.281	n.a	n.a	n.a	n.a	Bradley et al., 2017a
	n.a	n.a	n.a	0.0105-0.903	n.a	n.a	n.a	n.a	Bradley et al., 2017b
	n.a	n.a	n.a	n.a-33.6	n.a	n.a	n.a	n.a	Ellrott et al., 2017
	n.a	n.a	n.a	n.a-0.21	n.a	n.a	n.a	n.a	Wessinger et al., 2017
	n.a	n.a	n.a	n.a-7.13	n.a	n.a	n.a	n.a	Bai et al., 2018
Mexico	36.1-73.3	n.a	2.6-9.6	n.a-7.13	n.a	n.a	n.a	n.a	Xing et al., 2018
	40.7-94.6	n.a	3.01-3.77	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Estrada-Arriaga et al., 2016
13.4-32.1	0.0576-0.21	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Estrada-Arriaga et al., 2016
	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	0.0103-107	n.a	Leser et al., 2018
Brazil	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Preser-Ayvariz et al., 2018
	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	1.29-1.33	Preser-Ayvariz et al., 2018
Iceland	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	1.36-1.48	Luja-Montdragón et al., 2019
	1.79-59	n.a	0.234-5.59	n.a	n.a	n.a	n.a	1.7-2.3	Charavello et al., 2016
Faroe Islands	4.15-9.66	n.a	7.42-7.56	0.0614-0.0779	n.a	0.149-7.81	n.a	n.a	Huber et al., 2016
	3.8187-16.7907	0.0075-0.0629	n.a	n.a	0.0017-0.008	0.239-0.31	n.a	n.a	Huber et al., 2016
Germany	86.2-142.3	3.4-6.4	n.a	0.001-0.643	n.a	n.a	n.a	n.a	Keo-Weasik et al., 2016
	n.a	n.a	n.a	<0.46-1.66	n.a	n.a	n.a	n.a	Trautwein et al., 2014
Spain	14-95	0.7-6.5	<0.001-0.47	<0.001-0.47	n.a	n.a	n.a	n.a	Fosselt et al., 2018
	n.a-5.927	n.a-1.252	n.a-0.013	n.a-0.013	n.a	n.a	n.a	n.a	Tsiler, & Zwiener, 2018
Portugal	70-325	0.06-58	0.1-0.24	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Carmona et al., 2017
	n.a	n.a	n.a-0.44	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Carmona et al., 2017
Romania	n.a	n.a	n.a-0.44	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Carrington et al., 2017
	n.a	n.a	n.a-0.44	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Moldovan et al., 2018
Greece	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	0.0414-0.0782	n.a	n.a	Moldovan et al., 2018
	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Caga-Ferrero et al., 2018
Turkey	<0.0251-1.167	<0.0167-0.026	n.a	n.a	n.a	0.147-0.237	n.a	n.a	Koma et al., 2015
	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Thomaidi et al., 2016
Saudi Arabia	4.02-31.2	<3-4.51	<0.00014-0.0141	<0.00014-0.0141	n.a	n.a	n.a	n.a	Guzel et al., 2018
	n.a	n.a	0.007-4.8009	0.007-4.8009	n.a	n.a	n.a	n.a	Shraim et al., 2017
China	n.a	n.a	0.051-2.917	0.051-2.917	n.a	n.a	n.a	n.a	Ali et al., 2017
	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a-0.045	n.a	n.a	Kong et al., 2016

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Emerging pollutant	Country	Concentrations ($\mu\text{g/L}$)		Source					
		WWTP Influent (min.-max.)	WWTP Effluent (min.-max.)	Surface Water (min.-max.)	Drinking Water (min.-max.)	Sludge ($\mu\text{g/g}$) (min.-max.)	Groundwater (min.-max.)	Hospital Effluent (min.-max.)	Source
		21-35	0.01-0.64	0.0016-5.8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Yao et al., 2018
		n.a.	n.a.	0.0002-0.1214	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Asghar et al., 2018
		2.42-53.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Yan et al., 2019
		n.a.	n.a.	0.01-8.747	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Char et al., 2018
Vietnam		n.a.	0.168-5.61	0.021-0.063	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Nguyen, 2018
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Mpondom et al., 2018
Cameroon		n.a.	0.167-0.566	0.065-0.316	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Archer et al., 2017
		3.585-9.228	28.2-67.2	0.004-0.391	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Trautwein et al., 2014
South Africa		0.9-2.0	26-810	<0.01-4.502	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Tisler, & Zwiener, 2018
		0.9-2.0	n.a.	15-222	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Posselt et al., 2018
Guanyurea		158-2100	<0.0283-0.627	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Kosma et al., 2015
		n.a.	0.035-0.122	0.0012-3.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Yao et al., 2018
Methylbiguanide		<0.0196-0.084	n.a.	<0.01-0.031	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Tisler, & Zwiener, 2018
		China	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		0.004-5.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		

n.a.: not available; bql: below quantification limit.

MET and its TPs towards different aquatic organisms (daphnids, fish, etc.).

2. Pathways to the environment: Life-cycle of metformin

The lifecycle begins with the manufacture of MET, which can lead to its direct discharge into liquid or solid waste systems. The manufactured MET is transported and distributed to hospital pharmacies, where is prescribed for patients with T2D, cancer and women with PCOS. Table 1 summarized MET consumption data of some countries in terms of prescriptions issued. Despite the increasing prevalence of diabetes worldwide, there is a currently huge knowledge gap about the consumption patterns of this anti-diabetic drug. In the future, it will be helpful to study its consumption pattern in order to provide a better diabetes control as well as to have better understanding and control on its environmental discharges.

Once administered MET is excreted unaltered form (Gong et al., 2012). Thereby, this waste material enter to the sewer system, where MET is partially transformed to GUA due to bacteria adaptation in the sewage pipes. Finally, this waste material is collected in WWTP, and either directly discharged untreated into the environment or passed through one or more treatment steps before being discharged as effluent into the natural aquatic environment.

If MET is treated in WWTPs, it can be bacterially transformed to its main TPs (GUA, MBG, 2,4-AMT, 2,4-DAT) (Tisler and Zwiener, 2018). Chlorination, phytoremediation and adsorption in graphene oxide (GO) are the only techniques that have shown high rates of removal (Quintão et al., 2016; Cui and Schröder, 2016; Moogouei et al., 2018; Zhu et al., 2017). However, these treatments are not applied in all WWTPs. In consequence, huge amounts of MET and GUA are released in to the aquatic environment where they can exhibit different toxicities in non-target organisms.

Other pathways for the entrance of MET into the environment or even worst into the human food web, are the use of sewage sludge as soil fertilizer and conditioner for plant growth, or the irrigation of fields directly with wastewater (Eggen and Lillo, 2012; Lesser et al., 2018).

3. Occurrence of metformin and its transformation products

MET and GUA have a K_{ow} of -4.3 and -2.5 at pH 7.4, respectively (ter Laak and Baken, 2014). Based on these properties, distribution in the aqueous phase for MET and GUA is expected to be high, which is demonstrated by its ubiquitous presence in surface, ground and drinking water.

Table 2 summarize the data collected from literature regarding the occurrence of MET and its TPs about its presence in the aquatic environment. Data collected have dates between 2014 and 2019, and will be discussed in the subsequent sections.

3.1. Wastewater

The maximum concentration of MET in WWTP influents was $702 \mu\text{g L}^{-1}$, in US (Oliverira et al., 2015). This value correspond to a WWTP that recives daily 8% effluents from a one mid-size hospital, with approximately 600 beds.

Other countries with high concentrations of MET in influents were Portugal with $325 \mu\text{g L}^{-1}$ (de Jesus Gaffney et al., 2017) and Germany with $142.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (Trautwein et al., 2014).

In Portugal, the WWTP receive urban and industrial wastewater from a combined sewage network, which may justifies the high influent concentrations of MET. However, what is even more remarkable is that MET values in WWTP effluents still being high.

Table 3
Removal of MET and its transformation products by various processes.

Method	Material	Metformin Concentrations	Time	Other conditions	Results	Source
Adsorption	0.003 g GO	10 mg/L	2.66 h	14.85–44.85 °C pH: 4–11	Qe: 47.1 mg/g Ka: 0.0007 g/mg•min RE: 80% in 0.33 h Uptake ↑ (pH: 4–6) ΔG° and ΔH°: - ΔS°: +	Zhu et al., 2017
	0.05 g TNTs	30 mg/L	3 h	27 °C pH: 6 Groundwater	Qe: 29.69 mg/g Ka: 0.6120 g/mg•min RE ↓ Qe: 4.66 mg/g Ka: 1.1008 g/mg•min	Orona-Návar et al., 2018
Biodegradation	0.4 g/L sludge	25–30 mg/L * 25–30 mg/L	40w 40w	n.a n.a	MET was completely degraded after 15 days GUA detected No significant decrease was observed after 27 days	Markiewicz et al., 2017a
	0.4 g/L sludge	20 mg/L MET	25d	Aerobic 20 °C	MET reached an average degradation of 76% The mineralization ranged from 0% to 51%	Markiewicz et al., 2017b
	0.5 mL sludge	215 mg/L (MET) + 245.2 mg/L (GUA) + 5000 mg/L (GLU) 245.2 mg/L (GUA) + 5000 mg/L (GLU) * 245.2 mg/L 215 mg/L (MET) + 5000 mg/L (GLU) 215 mg/L	30d 20d 20d 10d 10d	Aerobic 30 °C pH: 7 Aerobic 30 °C pH: 7 Aerobic 30 °C pH: 7 Aerobic 30 °C pH: 7 Aerobic 30 °C pH: 7	40% of GUA degraded after 4d 34% of MET was degraded from day 20 to 30 (no further degradation) GUA was completely degraded after 12 days 25% of GUA was degraded after 19 days MET was completely degraded after 7 days GUA reached a maximum of 111.3 mg/L after 9 days MET was completely degraded after 9 days GUA bdl	Briones et al., 2018
	3 g/L sludge 8 g/L sludge	5 mg/L (MET) + 13 mg/L (GUA) 40 mg/L (MET + 40 mg/L GUA) 9 mg/L	n.a n.a n.a	Aerobic 22 °C Aerobic	99% of MET degraded after 12 days GUA reached 90% of MET concentration after 12 days	Tisler and Zwiener, 2019
	30 g/L sludge	9 mg/L 6 mg/L * 8 mg/L	n.a n.a n.a	Aerobic 22 °C Anaerobic 22 °C Anaerobic 22 °C Anaerobic 22 °C	98% of GUA degraded after 45 days MBG reached a maximum of 0.05 μmol/L after 7 days MBG was no longer detectable after 17 days 2,4-AMT reached a maximum of 0.37 μmol/L after 7 days After 45 days 0.08 μmol/L of 2,4-AMT were still detectable GUA was completely degraded after 47 days MBG show similar trend 2,4-AMT reached the maximum amount after 21 days 2,4-DAT detected MET was completely transformed into GUA after 5 days GUA was completely degraded after 36 days 2,4-AMT reached a maximum of 4 μmol/L after 14 days 57% of 2,4-AMT was incomplete degraded after 24 days MET was completely degraded after 40 days GUA was completely degraded after 17 days MBG and 2,4-AMT were completely degraded after 40 days GUA was completely degraded after 8 days	

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Method	Material	Metformin Concentrations	Time	Other conditions	Results	Source
Photodegradation	UV-C	10 mg/L	30 min	-	9.2% of MET was degraded	Quintão et al., 2016
	UV254	2 μmol/L	70 min	120 mg/L of TiO ₂ 21.85 °C 300–600 μM 21.85 °C 300–600 μM 30–60 μM 21.85 °C	0.72% if mineralization 31% of MET was degraded K: 0.0037/min Kd: 0.0029–0.0152/min Kd: 0.0038–0.0055/min	
Phytoremediation	Typha latifolia	6.5–32.3 mg/L MET	28d	n.a	R: 74–81.1% Ka: 0.0631–0.0969/d MBG increased at a maximum concentration of 26.7 nmol/g	Cui and Schröder et al., 2016
	Amaranthus retroflexus Phragmites australis Ricinus communis Brassica napus Celosia cristata Helianthus annuus	20 mg/L MET 50 mg/L MET	14d	pH: 5.5	R: 63% R: 58.4% R: 50.03% R: 35.7% R: 45.06% R: 21% R: 31.06% R: 56.98% R: 58% R: 58.1% R: 69.53% R: 65.7%	Moogouei et al., 2018
Other	10 mg/L NaClO 8 mg/L Ozone	10 mg/L	30 min	23 °C -	60% of MET was degraded 60% of MET was degraded 20% of mineralization	Quintão et al., 2016
	60 mg/L SME + 20 mg/L CS	230.8 ng/L (WWTP)	1 h	pH: 7	21% of MET was degraded	Mohd Amin et al. (2016)

* Guanylurea concentrations; n.a.: not available; Ks: sorption coefficient; D: desorption; GO: graphene oxide; Qa: adsorption quantity; RE: removal efficiency; TNTs: titanate nanotubes; Ka: adsorption rate; Kd: degradation rate constant; MWHC: Maximum water holding capacity; bdl: below detected; R: remediation; SME: Smectite; CS: clay starch.

This could be because effluents were treated with a biological system, which is known to be poorly efficient in the removal of MET.

On the other hand, in Germany, Trautwein et al. (2014), reported influent and effluent concentrations of a WWTP designed for 600,000 population equivalent. Although this WWTP also use a biological treatment, MET was removed in a 95.5%, reaching a maximum concentration of 6.4 μg L⁻¹. Nevertheless, GUA was detected in concentrations of concern, with 67.2 μg L⁻¹ in effluents.

More recently Tisler and Zwiener (2018) reported GUA concentrations were higher than MET concentrations. In this case, there was no direct correlation between MET degradation and GUA formation, since only 25% on molar basis of degraded MET could be found as GUA. This indicates there could be other biotic or abiotic removal processes for MET which may form other TPs such as: MBG, 2,4-DAT and 2,4-AMT. In fact, in this study MBG was detected in the effluents with a concentration of 0.122 μg L⁻¹, and even though 2,4-DAT and 2,4-AMT were not quantified, both compounds showed similar increasing response trends, with higher concentrations in the effluent than in the influent.

3.2. Surface water

Increasing evidence suggests MET and its TPs pass through or are formed in WWTPs, which means effluents are the major source of these contaminants in surface water. Once MET and its TPs enter the environment, its presence, persistence and quantity are largely determined by the volume of consumption, removal rate in WWTPs and by a dilution factor in surface water. Hence, it is expected, the concentration of MET and its TPs will be lower in receiving water bodies.

The highest concentration of MET in surface water was found in US by Elliott et al. (2017). They collected a total of 292 surface-water samples from 12 US tributaries. From all these samples,

MET reached a detection frequency of 71% and a maximum concentration of 33.6 μg L⁻¹.

Nonetheless, as it was expected, higher concentrations of GUA have been found in surface water. For instance, in Germany, Posselt et al. (2018) collected multiples samples from Erpe River, which receives effluent water from several smaller WWTPs and one large WWTP. Between all the drugs quantified, GUA reached a maximum concentration of 222 μg L⁻¹.

3.3. Groundwater

Groundwater contamination has become a growing public concern, because of the dramatically increasing fresh water demand. However, compared to the numerous efforts undertaken to evaluate contamination of surface water, the quality of groundwater is relatively poorly understood. Thus, there is little information available on groundwater quality, particularly with respect to MET and its TPs.

From 2014 to 2019, only two studies reported concentrations of MET on groundwater. Kong et al. (2016) sampled 17 domestic wells in North China, and reported a maximum concentration of 0.045 μg L⁻¹, with a 7.4% of detection frequency, and Lesser et al. (2018) collected samples from 17 groundwater wells of the Mezquital Valley, which receives more than 70% of the wastewater generated by Mexico City Metropolitan Area (21 million inhabitants). Here, MET reached a maximum concentration of 0.029 μg L⁻¹.

3.4. Drinking water

Groundwater is the most reliable source of public drinking water in many regions of the world. Nonetheless, surface and ground water are closely related, and can transfer contaminants

from one to another. Thereby, groundwater resources are increasingly threatened by chemical contaminants like MET and its TPs, and could potentially be transferred to humans through drinking water.

In Poland, Kot-Wasik et al. (2016) studied treated water, which is basically drinking water, from a water treatment plant (WTP). This water supplies many districts and several villages in Poland. According to their results, MET reached a 64% of detection frequency and a maximum concentration of $0.008 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.5. Sludge

In extend to our knowledge to date only, three studies have reported the presence of MET on sludge. Huber et al. (2016) collected sludge samples from three different countries, Iceland, Greenland and Faroe Island, and reported $7.81 \mu\text{g g}^{-1}$, $0.55 \mu\text{g g}^{-1}$ and $0.31 \mu\text{g g}^{-1}$ concentrations of MET, respectively. The other two studies were performed in Greece. Gago-Ferrero et al. (2015) collected sewage sludge from five WWTPs and an island, in this study MET reached a maximum concentration of $0.078 \mu\text{g g}^{-1}$.

Lastly, Thomaidi et al. (2016) investigated the occurrence of 50 pharmaceuticals, included MET, in samples were collected at the Athens STP. MET was quantified with a maximum concentration of $0.23 \mu\text{g g}^{-1}$.

As MET is widely use for the treatment of diabetes, and its consumption has risen steadily in the last years. Hospital activities and pharmaceutical manufacturers are the major source of these contaminants via effluent. It is recommended that healthcare and pharmaceutical facilities monitor and assess their discharges in order to reduce the loading of MET to sensitive water bodies. MET and GUA have been found in high concentrations in effluents and surface waters. This because, most of the countries lack of efficient techniques to remove these contaminants from WWTPs. Future works should try to enhance the efficiency of these old techniques or develop new techniques with high removal rates.

Finally, little information is known about the occurrence of GUA and other TPs in the aquatic environment. Future works should stimulate research to understand the potential risk of these contaminants to the water bodies.

4. Removal

Overall, the mechanisms involved in the removal of pharmaceuticals in WWTPs are adsorption, biodegradation, abiotic degradation and phytoremediation. Due to its low K_{ow} , MET and GUA are expected to be removed in WWTPs mainly through phytoremediation.

The following section briefly discusses the removal efficiency of MET achieved under different treatments techniques. Additionally, Table 3 summarizes the removal rates of MET during each treatment process.

4.1. Adsorption of MET

Graphene oxide (GO) can be used as an adsorbent to remove MET from water, Zhu et al. (2017) carried out a study under different temperatures and pH values. In this study, GO exhibited a high adsorption capacity, with an 80% of MET removed within 20 min. However, the adsorption capacity was strongly dependent on temperature, pH and ionic strength.

Orona-Návar et al. (2018) evaluated the adsorption behavior of six organic pollutants, using titanate nanotubes. MET was quickly adsorbed onto nanotubes, when the compounds was dissolved in ultra-pure water. However, removal efficiency decreased in ground water matrices, due to the presence of other ions, which interact with the active sites at the titanate nanotubes.

4.2. Biodegradation of MET

Markiewicz et al. (2017a) used activated sewage sludge to tested primary biodegradation of MET, GUA, and other antidiabetic drugs. MET was completely eliminated in 15 days, with the gradual appearance of GUA. However, one of the replicates exhibited a long lag phase, indicating a two-step conversion of MET to GUA. A double dealkylation was proposed as a possible degradation pathway of MET degradation.

Briones et al. (2018) used glucose (GLU) as co-substrate to enrich cultures with specific degraders of MET and GUA. As a single substrate, GUA only reached a 25% of degradation after 19 days. However, in the presence of GLU, it was completely degraded, after

Table 4
Bioconcentration and bioaccumulation of metformin and guanyurea.

Species	Metformin Concentrations ($\mu\text{g/g}$)(min-max)	BCF or BAF	Source
<i>Hordeum vulgare</i>	n.a-5.0 * n.a-2.65	BCF: 0.91	Eggen and Lillo, 2012
<i>Vicia faba</i>	n.a-4.85 * n.a-4.25	BCF: 0.88	
<i>Solanum tuberosum</i>	13.27-15.83 * 2.60-5.66	BCF: 2.41	
<i>Avena sativa</i>	n.a	BCF: 1.35	
<i>Brassica rapa</i>	n.a	BCF: 21.72	
<i>Brassica napus</i>	n.a	BCF: 20.63	
<i>Daucus carota</i>	n.a	BCF: 1.50-3.52	
<i>Solanum lycopersicum</i>	n.a	BCF: 0.02-0.06	
<i>Cucurbita pepo</i>	n.a	BCF: 0.12-0.18	
<i>Triticum aestivum</i>	n.a	BCF: 0.29	
<i>Lasmigona costata</i>	n.a-0.00665	BAF: 0.66	De Solla et al., 2016
<i>Typha latifolia</i>	1.2913-1.462.13	BAF: 0.09-53.34	Cui and Schröder, 2016
<i>Leptocottus armatus</i>	n.a-0.028 n.a-0.0278	n.a BCF: 1.42	Meador et al., 2017
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	n.a-0.04 n.a-0.0395	n.a BCF: 1.42	Meador et al., 2018
<i>Oryzias latipes</i>	n.a-3,120	n.a	Yeh et al., 2017
<i>Leptophlebidae</i>	0.0402-0.312	n.a	Meador et al., 2018
<i>Economidae</i>	n.a-0.0284	n.a	Ussery et al., 2018
		n.a	Althakafy et al., 2018

* Guanyurea concentrations; n.a = not available; BCF: bioconcentration factor; BAF: bioaccumulation factor

12 days. This evidence suggests, microbes only used GUA as a nitrogen source, when there is an absence of easily biodegradable carbon.

Finally, Tisler and Zwiener (2019) carried out a study to investigate the formation and biodegradation of GUA and other TPs of MET. From this study, they showed GUA degradation was much faster under anaerobic conditions, whereas MET degradation was fast under aerobic conditions.

4.3. Photodegradation

Quintão et al. (2016) evaluated MET degradation through photolysis (UV-C) and photocatalysis (TiO₂/UV-C). Both methods led to a low degradation of MET, with removal efficiencies of 9.2% for UV-C and 31% for TiO₂/UV-C, after 30 min.

On the other hand, Neamțu et al. (2014) compared the photolytic degradation of eight micropollutants exposed to UV₂₅₄ nm in the presence of H₂O₂ and Fe(II). According to their results, MET was one of the most persistent compounds, with less than 24% of removal, after 60 min of treatment.

4.4. Phytoremediation

Cui and Schröder (2016) assessed the removal efficiency of MET by *Typha latifolia*. After 28 days, the removal efficiency reached a range of 74–81.1%. The study concludes that MET can be efficiently removed from aqueous solutions by *Typha latifolia* plants.

Moogouei et al. (2018) evaluated the uptake of MET using arid and semi-arid plants. According to their results, *H. annuus* showed the highest removal efficiency, suggesting that this plant could be considered a potential candidate for phytoremediation of wastewater in a future.

4.5. Other methods

During their study of photolysis and photocatalysis, Quintão et al. (2016) also assessed the degradation of MET, using an ozonation and chlorination process. In this case, both processes showed similar capacities in the depletion of MET, reaching a removal efficiency of 60% after 30 min. However, five by-products were detected, and also were persistent after the treatment.

As a new alternative for the removal of pharmaceuticals in WWTPs effluents, Mohd Amin et al. (2016) tested a combination of clay with biodegradable polymeric flocculants. This clay-starch combination achieved the removal of 70% of the total measured pharmaceutical compounds. However, MET only reached a 21% of removal after 60 min of treatment.

Biological treatments could be efficient for the removal of MET under aerobic conditions, due to its fast degradation. Nonetheless, sequencing batch reactors in WWTPs mostly work under anaerobic and anoxic conditions, which implies a non-quickly and fully degradation of MET. These treatments not only do not remove MET from wastewater, but also produce other TPs, which were also found in high concentrations in multiple water bodies.

Ozonation, chlorination and photodegradation processes do not lead to the complete degradation of MET. These processes should be complemented with other treatment techniques like GO and phytoremediation. We mention these two, because both have reached high removal rates of MET in few time. However, future works should focus trying to demonstrate their efficiency in WWTPs.

5. Toxic effects

The occurrence of MET and its TPs has become a progressively important issue, due to its ubiquitous distribution in the aquatic environment. These contaminants can cause oxidative stress and reproductive toxicity, through endocrine disruption, on non-target organisms (Niemuth and Klaper, 2015; Lee et al., 2019). Due to its high volumes of discharge, its high persistence for degradation and their potential toxic effects on aquatic organisms, it is suggested that MET and its TPs can become a worldwide threat.

Following sections will discuss the bioaccumulation of MET and its TPs in aquatic animals and plants, as well as the toxic effects on non-target organisms are also discussed. For this purpose, data was summarized in Table 4 and 5.

5.1. Bioconcentration and bioaccumulation

MET and GUA concentrations, as well as bioconcentration factors (BCFs) and bioaccumulation factors (BAFs) for these compounds are summarized in Table 4.

Eggen and Lilo, 2012 investigated the uptake and translocation of MET in edible plant species, and found that MET is accumulated in oily plant tissues. Seeds of rape reached the highest BCF value with 21.72. In comparison, BCFs for grains (cereals wheat, barley and oat) (0.29–1.35), tomato (0.02–0.06), squash (0.12–0.18), bean (0.88) carrot (1.50–3.52) and potato (2.41) were much smaller.

Cui and Schröder, 2016 assessed the uptake and translocation of MET in *Typha latifolia*. Their results showed that MET concentration, in roots, increased the first two weeks of the experiment, until a maximum of 1462.13 μg g⁻¹, but thereafter decreased concentrations. This, could be, due to MET was translocated to other tissues such as rhizomes and leaves.

Regarding aquatic animals, six studies have been carried out in five different species. Le Doujet (2016) exposed juvenile Atlantic salmon to different concentrations of MET during 3, 7 and 10 days. The detected amount of drug measured in carcasses and gills was relatively low compared to the nominal concentration of MET. However, a higher accumulation pattern of MET in gills was observed at the exposure time of 3 days.

De Solla et al. (2016), who measured MET concentrations in caged freshwater mussels, from the Grand River. Although, researchers demonstrated that mussels bioaccumulate other drugs, MET showed no significant uptake or accumulation in mussels.

Meador et al. (2017) studied two fish species from three local estuaries, staghorn sculpin and juvenile Chinook salmon. According to their results, only staghorn sculpin reached a MET concentration above of the reporting limits, with a maximum concentration of 0.028 μg g⁻¹. One year later, they also conducted a laboratory study with 400 juvenile Chinook salmon. Fishes were dosed for 32 days and MET achieved a maximum concentration of 0.039 μg g⁻¹; similar results were reported by Yeh et al. (2017) under the similar conditions.

Ussery et al. (2018) exposed embryonic and larval stage of Japanese medaka for either 24 or 168 h to 10 μg L⁻¹ of MET. Their results, suggest MET that the hardening of the chorion influenced MET uptake and accumulation, since embryos exposed to MET, prior to hardening reported to have higher MET concentrations. Additionally, they also quantified body-burden of MET in larvae, and determined the rate at which larvae medaka can depurate MET after an exposure of 24 h. Body-burden of MET reached a maximum of 3120 μg g⁻¹, and once larvae were transferred to clean water, MET was rapidly excreted, with body-burdens below detection limit within the 24 h.

Table 5
Toxicity produced for metformin and guanylurea.

Species	Metformin Concentrations	Time	Results	Source
<i>Pimephales promelas</i>	40 µg/L	365d	Males: Intersexuality (Frequent PNF and possibly cortical alveolar oocytes clumping throughout testis) Weight ↓	Niemuth and Klaper, 2015
	40 µg/L	28d	Males: VTG mRNA expression ↑	Niemuth et al., 2015
	1, 10, 100 µg/L	7d	Adult: No significant differences Juvenile: VTG mRNA, ERα mRNA, CYP3A126 mRNA, GnRH3 mRNA ↓	Crago et al., 2016
	40 µg/L	365d	AR mRNA, HSD3 mRNA, HSD17β mRNA, CYP19A1 mRNA, and SULT2A1 mRNA ↓	Niemuth and Klaper, 2018
<i>Danio rerio</i>	12.1, 121, 1210, 12100 ng/L	96 h	EOMES mRNA ↓	Johnson, 2018
	12.1, 121, 1210, 12,100	96 h	Neutrophil degranulation no change MPO mRNA no change	Gordon, 2018
	0.1, 1, 10 µg/L	24 h	KISS1 and KISS1R mRNA ↓	Crago et al., 2016 (Unpublished)
	0.01, 0.1, 1, 10, 100 µM	72 h	GnRH3 mRNA ↓ Mean angle ↓	Monshi, 2017
<i>Oryzias latipes</i>	100, 180, 330, 600, 1100, 1500, 2000 mg/L	96 h	Maxim accumulated distance ↓ LC ₅₀ = 1315.5 mg/L	Godoy et al., 2018
	0.05, 0.5, 5, 50, 100, 180, 330, 600 mg/L	120 h	Scoliosis and abnormal pigmentation No significant differences	
	20, 40, 80, 160, 320, 640 mg/L	96 h	LC ₅₀ = 383.3 mg/L	Lee, 2017
	3, 10, 30, 100, 300 mg/L	30d	NOEC (survival) = 100 mg/L	
<i>Betta splendens</i>	0.03, 0.3, 3, 30 mg/L	21d	VTG1 mRNA and VTG2 mRNA ↓ Males: E2, ERα mRNA, ERβ mRNA, VTG1 mRNA, VTG2 mRNA, FSHR mRNA, LHR mRNA, STAR mRNA, CYP11a mRNA, HSD3β mRNA, HSD11β2 mRNA and CYP11b mRNA ↓ T, 11-KT and CYP17 mRNA ↓ Females: 11-KT and CYP11b mRNA ↓ HSD11B2 mRNA ↓	
	10 µg/L	24 h	ET ₅₀ (deposition) = 4.88 h	Ussery et al., 2018
	1, 3.2, 10, 32, 100 µg/L	28d	Stearic acid, palmitic acid, methyl-nicotinamide, and arachidic acid ↓	
	3.2 µg/L	165d	Weight, length, HCD mRNA, HGS mRNA and L-proline ↓ Females: 11-KT ↓	
	* 1, 3.2, 10, 32, 100 ng/L	28d	Weight and length ↓	Ussery et al., 2019
	* 1 ng/L y 7.5 µg/L	165d	No significant differences	
	3.2 µg/L (MET) + 7.5 µg/L (GUA)	165d	No significant differences	
	40, 120, 360 µg/L	4w	Males: CYP19a mRNA, ERα mRNA and ROS ↓	Lee et al., 2019
	40, 120, 360 µg/L	15w	VTG1 mRNA and GSH ↓ Gonad intersex Females: ERα mRNA and CAT ↓ ERβ1 mRNA and VTG2 mRNA ↓ Spermatogonium-stage cells formation	
			Males: Gonad intersex Females: Spermatogonium-stage cells formation	
<i>Betta splendens</i>	40 µg/L	4w	Males: Time exhibiting gill flaring and tail beats ↓	MacLaren et al., 2018
	80 µg/L	20w	Males: Time exhibiting gill flaring and fin spreading ↓ Males: Time exhibiting gill flaring and tail beats ↓	
<i>Salmo trutta fario</i>	1, 10, 100, 1000 µg/L	95d	Males: Time exhibiting gill flaring and fin spreading ↓ Liver glycogen ↑	Jacob et al., 2018
	1, 10, 100, 1000 µg/L	108d	Weight ↓ Liver glycogen ↑	
<i>Limnodynastes peronii</i>	0.5, 5, 50, 500 µg/L	30d	Weight ↓ Weight, glutamate, leucine, isoleucine, valine, and lactic acid ↓ Length ↓	Melvin et al., 2017
<i>Daphnia magna</i>	* 5–150 mg/L	48 h	EC ₅₀ (immobilization) = 40 mg/L	Markiewicz et al., 2017
	20, 40, 80, 160, 320 mg/L	48 h	EC ₅₀ (immobilization) = 81.4 mg/L	Lee, 2017
<i>Daphnia similis</i>	2.5, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L	21d	NOEC (survival) = 40 mg/L	
	5, 8, 12.5, 20, 30, 50 mg/L	48 h	EC ₅₀ (immobilization) = 14.3 mg/L	Godoy et al., 2018
	1, 3, 5, 8, 11 mg/L	14d	EC ₁₀ (reproduction) = 4.4 mg/L	

(continued on next page)

Table 5 (continued)

Species	Metformin Concentrations	Time	Results	Source
<i>Brachionus calyciflorus</i>	25, 50, 100, 200 µg/L	16d	r ↓	García-García et al., 2017
<i>Platyonus patulus</i>	25, 50, 100, 200 µg/L	16d	r ↓	
<i>Mytilus edulis</i>	40 µg/L	7d	VTG mRNA expression ↓ NRRT and V9 mRNA expression ↓ Follicle degeneration and gamete degradation	Koagouw and Gocan, 2018
<i>Planorbarius corneus</i>	0.01, 0.1, 1, 10 mg/L	35d	Hsp70 ↓	Jacob et al., 2019
	* 0.1, 10, 100 mg/L	21d	Weight ↓ Dilation of the lumen, vacuolization in crypt cells and protrusion of the apex in digestive cells Hsp70 ↓ Weight ↓ Dilation of the lumen, disturb of the compartmentation in the digestive cells, deform of the nuclei, hyperplasia, hypertrophy, and vacuolization in crypt cells	
<i>Lemna minor</i>	6.2, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 mg/L	7d	EC ₅₀ (growth inhibition) = 53.7 mg/L	Godoy et al., 2018
<i>Hydra attenuate</i>	2300, 2700, 3100, 3600, 4200, 5000 mg/L	96 h	LC ₅₀ = 3918 mg/L	
	200, 360, 650, 1200, 2000 mg/L	7d	EC ₁₀ (reproduction) = 701.8 mg/L	
<i>Chlorella vulgaris</i>	1.5, 76.8, 767.8 mg/L	96 h	NPQ ↓ Culture density, ETR, α, Ek and φPSII ↓	Cummings et al., 2018

* Guanylurea concentrations; * metformin + bezafibrate + atorvastatin mixture concentrations; ; VTG: vitellogenin; ER: estrogen receptor; GnRH3: gonadotropin-releasing hormone 3; KISS1: kisspeptin KISS1R: kisspeptin receptor; E2: 17β-estradiol; FSHR: follicle stimulating hormone receptor; LHR: luteinizing hormone receptor; STAR: steroidogenic acute regulatory protein; HSD3β: 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/ delta 5 delta 4-isomerase; HSD11β2: hydroxysteroid 11-β dehydrogenase 2; T: testosterone; 11-KT: 11-ketotestosterone; NPQ: non-photochemical quenching; ETR: electron transport rate; α: electron transport; E_c: minimum saturating irradiance; φPSII: effective quantum yield of PSII; PNF: peri nucleolar follicles; ROS: reactive oxygen species; GSH: glutathione; CAT: catalase; NRRT: neutral red retention time; V9: vitelline envelope zona pellucida domain 9; Hsp70: heat shock protein 70; AR: androgen receptor; HSD17β: 17β-hydroxysteroid dehydrogenase; SULT2A1: sulfotransferase family 2A member 1; r: rate of population increase; HCD: β HYDROXYACYL-CoA dehydrogenase; HGS: HMG-CoA synthesis; EOMES: eomesodermin homolog a; MPO: myeloperoxidase.

Finally, Althakafy et al. (2018), quantified six PPCPs in seven invertebrate samples. MET was detected in two different species, may fly and caddis fly. The maximum concentrations of MET found in both invertebrates were 0.312 µg g⁻¹ and 0.028 µg g⁻¹, respectively.

5.2. Toxicological effects

In order to discuss the toxic effects produced by MET and GUA in non-target organisms, the reported results were sorted out according to the species under study, as is shown in Table 5.

5.2.1. Fish

5.2.1.1. *Pimephales promelas*. Niemuth et al. (2015) assessed the effects of MET at environmentally relevant concentrations in fathead minnows. Their results showed MET induced significant up-regulation of VTG in male fish, indicating endocrine disruption. It is thought VTG overexpression may occur as a result of the drug's effects on insulin signaling.

For the same year, Niemuth and Klaper (2015) evaluated male tissues intersexuality, in FHMs exposed to MET. According to their results, exposed FHMs exposed to MET showed a high oocytes occurrence throughout testicular tissue. Suggesting that, MET causes the development of intersex gonads in males, as well as reduce fecundity.

Three years later, Niemuth and Klaper (2018) measured the expression of numerous endocrine-related genes. Their study demonstrated significant up-regulation of the AR, 3β-HSD, 17β-HSD, CYP19A1, and SULT2A1 genes in the testis of FHM exposed to MET.

Finally, Johnson (2018), exposed FHMs to different drugs for 96 h at diverse concentrations in order to identify their effects on T cells. Expression of eomes in the spleen was significantly decreased in FHMs exposed to MET, which may suggest a state of

immune suppression, leaving organisms vulnerable to a viral infection.

5.2.1.2. *Danio rerio*. Crago et al., 2016 reported an increased expression of kisspeptin and kisspeptin receptor at 24 h post fertilization (hpf). Additionally, after 72hpf, expression of GnRH3 was also increased. This relation may be explained, because kisspeptin is vital for the central regulation of GnRh neurosecretory activity and timing puberty.

Monshi (2017) evaluated the behavioral effects of many emerging drugs contaminants (EDCs) in *Danio rerio*. According to their results, MET decreased maximum accumulated distance, and increased the mean angle in a concentration-dependent manner.

Finally, Godoy et al. (2018), reported scoliosis and abnormal pigmentation appeared in embryos exposed to MET, at concentrations of 1100 mg L⁻¹. In addition, they also performed a behavioral assay, where locomotor activity of zebrafish embryos was evaluated. However, researchers reported that the swimming behavior seems not to be disrupted by MET.

5.2.1.3. *Oryzias latipes*. Lee (2017), investigated the acute and chronic toxicity effects, as well as endocrine disruption effects of MET on this fish. In their study, embryos reached a LC50 of 383.3 mg L⁻¹ and a survival NOEC of 100 mg L⁻¹. Additionally, male fish exposed to MET showed estrogenic effects, due to an up-regulation on the transcription of the VTG gene transcription.

In an early life stage study (ELS-study), Ussery et al. (2018), demonstrated that fish length and wet weight of larval was significantly decreased by MET. Also, several metabolites associated with cellular energetics as well as with proliferation were significantly altered. One year later, Ussery et al. (2019) carried out a study to characterize GUA toxicity effects on the growth of larval medaka, as well as its persistence into adulthood. Their results showed that fish length and wet weight of larval was significantly decreased by GUA. Growth effects produced by GUA were similar

to those found in medaka exposed to MET. However, these effects occurred at lesser concentrations.

Finally, Lee et al. (2019) evaluated reproductive toxicity and oxidative stress markers in *Oryzias latipes*. According to their results, transcriptions levels of ER α and CYP19a were elevated in male fish, meanwhile on female fish, gene expression of ER β 1 and VTG2 was significantly decreased. Spermatogonium stage cells were observed in female gonads. This suggest MET caused an endocrine disruption in both sex of *O. latipes*.

5.2.1.4. *Betta splendens*. MacLaren et al. (2018) performed a behavioral study to evaluate aggressiveness of Simase fighting fish after a chronic exposure to MET. After 4 weeks and 20 weeks, an iPad recorded the number and duration of gill flaring, fin spreading and tail beats. Their results showed fish exhibited less aggression toward a dummy male.

5.2.1.5. *Salmo trutta fario*. To investigate, whether MET impact the gut microbiome, and carbohydrate metabolism of brown trout; Jacob et al. (2018) exposed *Salmo trutta fario* embryos to 5 different concentrations of MET. In general, their results showed that the hepatic glycogen increased in the exposed larvae. Additionally, microbiome analyses indicated an effect of MET on intestinal bacteria, with an increase of Protobacteria and a reduction of Actinobacteria.

5.2.2. Amphibians

5.2.2.1. *Limnodynastes peronii*. To the extent of our knowledge this is the only study found, that have evaluated MET effects on growth and development in amphibians. Melvin et al. (2017), they exposed *Limnodynastes peronii* tadpoles to a mixture of drugs widely used to treat metabolic syndrome. In their results demonstrated, tadpoles did not show any significant differences in hepatic triglycerides or cholesterol. However, there was an increase, in glutamate, leucine, isoleucine and valine.

5.2.3. Crustaceans

5.2.3.1. *Daphnia magna*. In order to check if MET, GUA and other six oral antidiabetic drugs might be an ecotoxicological threat, Markiewicz et al., 2017 carried out an acute immobilization test in *Daphnia magna*. At the end of the test, researchers reported an EC50 value of 40 mg L⁻¹ for GUA.

As mentioned above, Lee (2017) investigated acute and chronic toxicity effects of MET, using Japanese medaka. However, in that study, he also performed an acute and chronic toxicity test with *Daphnia magna*. In this case, after 48 h, embryos reached an EC50 of 81.4 mg L⁻¹. Additionally, survival NOEC was determined at 21d, and got value of 40 mg L⁻¹.

5.2.3.2. *Daphnia similis*. For *D. similis*, Godoy et al. (2018) performed an acute and chronic toxicity test. In both test, neonates were exposed to different concentrations of MET, for 48 h and 14d, respectively. In acute test, immobile daphnids were recorded, while in chronic exposure, reproduction was assessed. The EC50 were 14.3 mg L⁻¹ and 4.4 mg L⁻¹, respectively.

5.2.4. Rotifers

5.2.4.1. *Brachionus calyciflorus* & *Platyonus patulus*. These two species of rotifers are widely used for testing the effects of toxicants and xenobiotics. For instance, García-García et al. (2017) quantify the population level changes in these two rotifers exposed to different MET concentrations. After 16d, the population growth of both rotifers was adversely affected by MET.

5.2.5. Mussels

5.2.5.1. *Mytilus edulis*. As numerous studies suggest, pharmaceutical levels, both in surface water and groundwater, are detected at higher concentrations during dry season. Based on this, Koagouw and Ciocan (2018) studied the cumulative effects of elevated temperature and high concentrations of MET. According to their results, mussels exposed to MET had a decline in neutral red retention time (NRRT), indicating a remarkable lysosomal membrane destabilization. Furthermore, MET caused follicle degeneration and gamete degradation, as well as an upregulation in VTG.

5.2.6. Snails

5.2.6.1. *Planorbis corneus*. Jacob et al. (2019) exposed the big Ramshorn snails to multiple concentrations of MET and GUA to assess their impact on the health of gastropod. Stress proteins and lipid peroxides did not show significant changes. However, in the histopathological analysis, dilatation of the lumen and a disturbed compartmentation of the digestive cells were observed. These observed reactions were only found at the highest concentration of both contaminants.

5.2.7. Aquatic plant

5.2.7.1. *Lemna minor*. Godoy et al. (2018), exposed *L. minor* plants to multiple concentrations of the antidiabetic drug. After 7 days, growth rates were determined according to the total frond area. The EC50 value was of 53.7 mg L⁻¹.

5.2.8. Hydroid

5.2.8.1. *Hydra attenuata*. Godoy et al. (2018) performed acute and chronic toxicity test in *H. attenuata*. Similarly, *Hydras* were exposed to different concentrations of MET. However, in this case, exposure times were 96 h and 7d, respectively. The LC50 and EC50 were 3918 mg L⁻¹ and 701.8 mg L⁻¹, respectively.

5.2.9. Algae

5.2.9.1. *Chlorella vulgaris*. This organism is cosmopolitan and shares similarities in photosynthetic machinery with land plants. Based on this, Cummings et al. (2018) evaluated, whether MET negatively affects chlorophytes photosynthesis. According to their results, non-photochemical quenching (NPQ) value increased over time, suggesting cells were less capable to use the same amount of light energy. Moreover, electron transport rate and minimum irradiance decreased, which also indicate a reduced capacity to process light energy.

Bioconcentration and bioaccumulation factors of MET and GUA suggest both contaminants are barely accumulated in animals. However, in oily plant tissues these contaminants are largely accumulated. It is important to regulate the use wastewater in the irrigation of farmlands, to avoid entrance of MET to the human food web. In general, strategies for assessing bioaccumulation potential of chemicals need to be further optimized and harmonized, as few studies quantify stationary concentrations. MET is well known as an endocrine disruptor, due to the overexpression that produces in many endocrine-related genes. However, the mechanism by which it is generated has not been elucidated.

Studies on early life stage are scarce, as only two authors have reported their results. Embryotoxicity and teratogenic effects of MET and its TPs should be further investigated.

Finally, as MET produced behavioral changes in two different species, *Danio rerio* and *Betta splendens*, it is recommended to study in extent the neurotoxicological effects of this antidiabetic drug.

6. Conclusions, future trends and perspectives

Although in North America and Europe have a huge volume of literature available regarding this topic, both continents still have extremely limited information on the occurrence of MET in oceans and seas. Furthermore, from 2014 to 2019, only Poland reported its MET concentrations in drinking water. Distribution, transport and fate of MET in marine and coastal regions, as well as in drinking water need to be further investigated. On the other hand, most of the countries have showed a lack of interest and necessity for monitoring the occurrence of GUA and other MET TPs. However, all these transformation products should be also monitored. Since MET is accumulated in edible plant species, fish and mussels, this drug could be considered as a potential hazard to the human health. It is necessary to enhance our efforts to remove MET from wastewater and sewage sludge. Further research is needed, in plants; to understand the uptake and translocation processes, and the possible biodegradation pathways of MET on these organisms. In animals, more toxicological studies should be performed to understand the effects of MET and its TPs, because the physiological, biochemical and genetical changes produced in the fish during its exposure to these contaminants are likely to modify the quality of the human food.

Regarding toxic effects, it is important that future works try to unify/harmonize/match their evaluation criteria, because there is an important fluctuation in the evaluation conditions, but also it is important to investigate the effects produced at environmentally relevant concentrations. It should be highlighted the lack of information regarding the toxic effects of GUA and other TPs, this should be urgently further investigated.

Until now, phytoremediation, biodegradation and adsorption have been the best methods to remove MET from water. However, these methods have showed lower removal rates in the field than in the laboratory. It is important to look new alternatives for the removal of this drug in wastewater. For instance, the combination of these methods could be a good option to improve the removal efficiency of MET in WWTPs. Finally as mentioned along this review, MET is highly encountered in the form of GUA in the environment, however there is a huge gap in the study of the removal of GUA from water, this should also be addressed promptly.

References

- Aitken, M., Kleinrock, M., Lyle, J., Nass, D., Caskey, L., 2015. Medicines Use and Spending Shifts: A Review of the Use of Medicines in the US in 2014. IMS Institute for Healthcare Informatics.
- Ali, A.M., Rønning, H.T., Alarif, W., Kallenborn, R., Al-Lihaibi, S.S., 2017. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in effluent-dominated Saudi Arabian coastal waters of the Red Sea. *Chemosphere* 175, 505–513.
- Althakafy, J.T., Kulsing, C., Grace, M.R., Marriott, P.J., 2018. Determination of selected emerging contaminants in freshwater invertebrates using a universal extraction technique and liquid chromatography accurate mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 41 (19), 3706–3715.
- Archer, E., Petrie, B., Kasprzyk-Hordern, B., Wolfaardt, G.M., 2017. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. *Chemosphere* 174, 437–446.
- Asghar, M.A., Zhu, Q., Sun, S., Shuai, Q., 2018. Suspect screening and target quantification of human pharmaceutical residues in the surface water of Wuhan, China, using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Sci. Total Environ.* 635, 828–837.
- Bai, X., Lutz, A., Carroll, R., Keteles, K., Dahlin, K., Murphy, M., Nguyen, D., 2018. Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. *Chemosphere* 200, 133–142.
- Blair, B., Nikolaus, A., Hedman, C., Klaper, R., Grundl, T., 2015. Evaluating the degradation, sorption, and negative mass balances of pharmaceuticals and personal care products during wastewater treatment. *Chemosphere* 134, 395–401.
- Bradley, P.M., Battaglin, W.A., Clark, J.M., Henning, F.P., Hladik, M.L., Iwanowicz, L.R., Romanok, K.M., 2017a. Widespread occurrence and potential for biodegradation of bioactive contaminants in Congaree National Park, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 36 (11), 3045–3056.
- Bradley, P.M., Journey, C.A., Button, D.T., Carlisle, D.M., Clark, J.M., Mahler, B.J., VanMetre, P.C., 2016. Metformin and other pharmaceuticals widespread in wadeable streams of the southeastern United States. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 3 (6), 243–249.
- Bradley, P.M., Journey, C.A., Romanok, K.M., Barber, L.B., Buxton, H.T., Foreman, W.T., Jones, D.K., 2017b. Expanded target-chemical analysis reveals extensive mixed-organic-contaminant exposure in US streams. *Environ. Sci. Technol.* 51 (9), 4792–4802.
- Briones, R.M., Zhuang, W.Q., Samah, A.K., 2018. Biodegradation of metformin and guanylurea by aerobic cultures enriched from sludge. *Environ. Pollut.* 243, 255–262.
- Carmona, E., Andreu, V., Picó, Y., 2017. Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish—Turia River as case study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 146, 117–125.
- Chau, H.T.C., Kadokami, K., Duong, H.T., Kong, L., Nguyen, T.T., Nguyen, T.Q., Ito, Y., 2018. Occurrence of 1153 organic micropollutants in the aquatic environment of Vietnam. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (8), 7147–7156.
- Chellappan, D.K., Yap, W.S., Gupta, G., Dua, K., 2018. Current therapies and targets for type 2 diabetes mellitus. *Panminerva Med.* 60 (3), 117–131.
- Chiarello, M., Minetto, L., Della Giustina, S.V., Beal, L.L., Moura, S., 2016. Popular pharmaceutical residues in hospital wastewater: quantification and qualification of degradation products by mass spectroscopy after treatment with membrane bioreactor. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (16), 16079–16089.
- Cho, N.H., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlrogge, A.W., Malanda, B., 2018. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 138, 271–281.
- Crago, J., Bui, C., Grewal, S., Schlenk, D., 2016. Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 232, 185–190.
- Cui, H., Schröder, P., 2016. Uptake, translocation and possible biodegradation of the antidiabetic agent metformin by hydroponically grown *Typha latifolia*. *J. Hazard. Mater.* 308, 355–361.
- Cummings, B.M., Needoba, J.A., Peterson, T.D., 2018. Effect of metformin exposure on growth and photosynthetic performance in the unicellular freshwater chlorophyte, *Chlorella vulgaris*. *PLoS One* 13, (11) e0207041.
- de Jesus Gaffney, V., Cardoso, V.V., Cardoso, E., Teixeira, A.P., Martins, J., Benoliel, M. J., Almeida, C.M.M., 2017. Occurrence and behaviour of pharmaceutical compounds in a Portuguese wastewater treatment plant: removal efficiency through conventional treatment processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (17), 14717–14734.
- De Solla, S.R., Gilroy, É.A., Klinck, J.S., King, L.E., McInnis, R., Struger, J., Gillis, P.L., 2016. Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care products in the unionid mussel *Lasmigona costata* in a river receiving wastewater effluent. *Chemosphere* 146, 486–496.
- Eggen, T., Lillo, C., 2012. Antidiabetic II drug metformin in plants: uptake and translocation to edible parts of cereals, oily seeds, beans, tomato, squash, carrots, and potatoes. *J. Agric. Food. Chem.* 60 (28), 6929–6935.
- Elliott, S.M., Bringham, M.E., Lee, K.E., Banda, J.A., Choy, S.J., Gefell, D.J., Jorgenson, Z. G., 2017. Contaminants of emerging concern in tributaries to the Laurentian Great Lakes: I. Patterns of occurrence. *PLoS One* 12, (9) e0182868.
- Estrada-Arriaga, E.B., Cortés-Muñoz, J.E., González-Herrera, A., Calderón-Mógora, C. G., de Lourdes Rivera-Huerta, M., Ramírez-Camperos, E., Martín-Domínguez, A., 2016. Assessment of full-scale biological nutrient removal systems upgraded with physico-chemical processes for the removal of emerging pollutants present in wastewaters from Mexico. *Sci. Total Environ.* 571, 1172–1182.
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., Viollet, B., 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 20 (6), 953–966.
- Gago-Ferrero, P., Borova, V., Dasenaki, M.E., Thomaidis, N.S., 2015. Simultaneous determination of 148 pharmaceuticals and illicit drugs in sewage sludge based on ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (15), 4287–4297.
- García-García, G., Reyes-Carrillo, G.J., Sarma, S.S.S., Nandini, S., 2017. Population level responses of rotifers (*Brachionus calyciflorus* and *Platyonus patulus*) to the anti-diabetic drug, metformin. *J. Environ. Biol.* 38 (6), 1213–1219.
- Ghoshdastidar, A.J., Fox, S., Tong, A.Z., 2015. The presence of the top prescribed pharmaceuticals in treated sewage effluents and receiving waters in Southwest Nova Scotia, Canada. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (1), 689–700.
- Godoy, A.A., Domingues, I., Nogueira, A.J.A., Kummrow, F., 2018. Ecotoxicological effects, water quality standards and risk assessment for the anti-diabetic metformin. *Environ. Pollut.* 243, 534–542.
- Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K.M., Altman, R.B., Klein, T.E., 2012. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet. Genomics* 22 (11), 820.
- Gordon, J., 2018. The effects of urban contaminants on neutrophils of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Culminating Projects Biol.*, 37.
- Guzel, E.Y., Cevik, F., Daglioglu, N., 2018. Determination of pharmaceutical active compounds in Ceyhan River, Turkey: seasonal, spatial variations and environmental risk assessment. *Human Ecol. Risk Assess.: Int. J.*, 1–16.
- Huber, S., Remberger, M., Kaj, L., Schlabach, M., Jörundsdóttir, H.Ó., Vester, J., Dam, M., 2016. A first screening and risk assessment of pharmaceuticals and additives in personal care products in waste water, sludge, recipient water and sediment from Faroe Islands, Iceland and Greenland. *Sci. Total Environ.* 562, 13–25.
- Information Services Division National Services Scotland, 2018. Prescribing & Medicines: Dispenser Payments and Prescription Cost Analysis. NHS National Services Scotland, Scotland. Available at: <https://www.isdscotland.org/Health->

- Topics/Prescribing-and-Medicines/Community-Dispensing/Prescription-Cost-Analysis/].
- Jacob, S., Dörsch, A., Knoll, S., Köhler, H.R., Rogall, E., Stoll, D., Triebkorn, R., 2018. Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)? *Environ. Sci. Europe* 30 (1), 48.
- Jacob, S., Köhler, H.R., Tisler, S., Zwiener, C., Triebkorn, R., 2019. Impact of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanlyurea on the health of the big ramshorn snail (*Planorbis cornuus*). *Front. Environ. Sci.* 7, 45.
- Johnson, C., 2018. The effects of acute urban mixture exposure on the t cells of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Culminating Projects Biol.*, 36.
- Kleinrock, M., 2012. The use of medicines in the united states: review of 2011. IMS Institute for Healthcare Informatics, Parsippany.
- Koagou, W., Cioacan, C., 2018. Impact of metformin and increased temperature on blue mussels *Mytilus edulis*-evidence for synergism. *J. Shellfish Res.* 37 (3), 467–475.
- Kong, L., Kadokami, K., Wang, S., Duong, H.T., Chau, H.T.C., 2015. Monitoring of 1300 organic micro-pollutants in surface waters from Tianjin, North China. *Chemosphere* 122, 125–130.
- Kong, L., Kadokami, K., Duong, H.T., Chau, H.T.C., 2016. Screening of 1300 organic micro-pollutants in groundwater from Beijing and Tianjin, North China. *Chemosphere* 165, 221–230.
- Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2015. Comprehensive study of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanlyurea in Greek wastewaters. *Water Res.* 70, 436–448.
- Kot-Wasik, A., Jakimska, A., Śliwka-Kaszyńska, M., 2016. Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants. *Environ. Monit. Assess.* 188 (12), 661.
- Le Doujet, T., 2016. Uptake, Organ Distribution and Physiological Effects of an Antidiabetic II Drug (Metformin) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Norwegian University of Science and Technology.
- Lee, J.W., Shin, Y.J., Kim, H., Kim, H., Kim, J., Min, S.A., Park, K., 2019. Metformin-induced endocrine disruption and oxidative stress of *Oryzias latipes* on two-generational condition. *J. Hazard. Mater.* 367, 171–181.
- Lee, S.Y., 2017. Assessment of Aquatic Toxicity and Endocrine Disruption Potential of Metformin, an Anti-diabetic Drug. Department of Environmental Health Sciences.
- Lesser, L.E., Mora, A., Moreau, C., Mahlknecht, J., Hernández-Antonio, A., Ramírez, A. I., Barrios-Piña, H., 2018. Survey of 218 organic contaminants in groundwater derived from the world's largest untreated wastewater irrigation system: Mezquital Valley, Mexico. *Chemosphere* 198, 510–521.
- Luja-Mondragón, M., Gómez-Oliván, L.M., SanJuan-Reyes, N., Islas-Flores, H., Orozco-Hernández, J.M., Heredia-García, G., Dublán-García, O., 2019. Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes. *Sci. Total Environ.* 660, 751–764.
- MacLaren, R.D., Wisniewski, K., MacLaren, C., 2018. Environmental concentrations of metformin exposure affect aggressive behavior in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *PLoS One* 13 (5), e0197259.
- Mallik, R., Chowdhury, T.A., 2018. Metformin in cancer. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 143, 409–419.
- Markiewicz, M., Jungnickel, C., Stolte, S., Bialk-Bielińska, A., Kumirska, J., Mroził, W., 2017a. Primary degradation of antidiabetic drugs. *J. Hazard. Mater.* 324, 428–435.
- Markiewicz, M., Jungnickel, C., Stolte, S., Bialk-Bielińska, A., Kumirska, J., Mroził, W., 2017b. Ultimate biodegradability and ecotoxicity of orally administered antidiabetic drugs. *J. Hazard. Mater.* 333, 154–161.
- Mayoum, E.V.T., Nguidjoe, E., Mballa, R.N., Tankoua, O.F., Fokunang, C., Anyakora, C., Blackett, K.N., 2018. Identification and quantification of 19 pharmaceutical active compounds and metabolites in hospital wastewater in Cameroon using LC/QC/QC and LC/QC-TOF. *Environ. Monit. Assess.* 190 (12), 723.
- Meador, J.P., Yeh, A., Young, G., Gallagher, E.P., 2016. Contaminants of emerging concern in a large temperate estuary. *Environ. Pollut.* 213, 254–267.
- Meador, J.P., Yeh, A., Gallagher, E.P., 2017. Determining potential adverse effects in marine fish exposed to pharmaceuticals and personal care products with the fish plasma model and whole-body tissue concentrations. *Environ. Pollut.* 230, 1018–1029.
- Meador, J.P., Yeh, A., Gallagher, E.P., 2018. Adverse metabolic effects in fish exposed to contaminants of emerging concern in the field and laboratory. *Environ. Pollut.* 236, 850–861.
- Medical Expenditure Panel Survey (MEPS), 2018. Agency for healthcare research and quality (AHRQ), Rockville, MD Available at: <https://clincalc.com/DrugStats/Drugs/MetforminHydrochloride>.
- Melvin, S.D., Habener, L.J., Leusch, F.D., Carroll, A.R., 2017. 1H NMR-based metabolomics reveals sub-lethal toxicity of a mixture of diabetic and lipid-regulating pharmaceuticals on amphibian larvae. *Aquat. Toxicol.* 184, 123–132.
- Mohd Amin, M.F., Heijman, S.G.J., Rietveld, L.C., 2016. Clay–starch combination for micropollutants removal from wastewater treatment plant effluent. *Water Sci. Technol.* 73 (7), 1719–1727.
- Moldovan, Z., Marinca, O., Povar, I., Lupascu, T., Longree, P., Rota, J.S., Alder, A.C., 2018. Environmental exposure of anthropogenic micropollutants in the Prut River at the Romanian-Moldavian border: a snapshot in the lower Danube river basin. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (31), 31040–31050.
- Monshi, M., 2017. Endocrine-Disrupting Properties Of Pharmaceuticals And Personal Care Products (ppcps): An Evaluation Using Aquatic Model Organisms. Wayne State University Theses, p. 578.
- Moogouei, R., Borghel, M., Hosseini, S., Tajadod, G., 2018. Potential of plant species for phytoremediation of metformin from solutions. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15 (3), 593–598.
- Morales, D.R., Morris, A.D., 2015. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu. Rev. Med.* 66, 17–29.
- Mulholland, A., 2018. Prescription Cost Analysis Northern Ireland 2017. Information and Registration Unit Family Practitioner Services Business Services Organization, Belfast. Available at: <http://www.hscbusiness.hscni.net/services/3032.htm>.
- National Statistics Ystadegau Gwladol, 2018. Prescriptions dispensed in the community: 2017. Welsh Government, Cardiff. Available at: <https://gov.wales/sites/default/files/statistics-and-research/2018-12/180523-prescriptions-dispensed-community-2017-en.pdf>.
- Neamtu, M., Grandjean, D., Sienkiewicz, A., Le Faucheur, S., Slaveykova, V., Colmenares, J.J.V., de Alencastro, L.F., 2014. Degradation of eight relevant micropollutants in different water matrices by neutral photo-Fenton process under UV254 and simulated solar light irradiation—a comparative study. *Appl. Catal. B* 158, 30–37.
- Nguyen, K.H., 2018. Analysis of Emerging Environmental Contaminations using Advanced Instrumental Tools: Application to Human and Environmental Exposure Doctoral dissertation. University of Birmingham.
- Niemuth, N.J., Jordan, R., Crago, J., Blanksma, C., Johnson, R., Klaper, R.D., 2015. Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (2), 291–296.
- Niemuth, N.J., Klaper, R.D., 2015. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* 135, 38–45.
- Niemuth, N.J., Klaper, R.D., 2018. Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. *Aquat. Toxicol.* 195, 33–40.
- Oliveira, T.S., Murphy, M., Mendola, N., Wong, V., Carlson, D., Waring, L., 2015. Characterization of pharmaceuticals and personal care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Sci. Total Environ.* 518, 459–478.
- Orona-Návar, C., García-Morales, R., Rubio-Govea, R., Mahlknecht, J., Hernández-Aranda, R.I., Ramírez, J.G., Ornelas-Soto, N., 2018. Adsorptive removal of emerging pollutants from groundwater by using modified titanate nanotubes. *J. Environ. Chem. Eng.* 6 (4), 5332–5340.
- Pérez-Alvarez, I., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Barceló, D., De Alda, M.L., Solsona, S.P., Galar-Martínez, M., 2018. Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, Mexico, and evaluation of their toxic impact. *Environ. Pollut.* 240, 330–341.
- Posselt, M., Jaeger, A., Schaper, J.L., Radke, M., Benskin, J.P., 2018. Determination of polar organic micropollutants in surface and pore water by high-resolution sampling-direct injection-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Processes Impacts* 20 (12), 1716–1727.
- Prescribing and Medicines Team Health and Social Care Information Centre, 2018. Prescriptions Dispensed in the Community - Statistics for England, 2007–2017. Health and Social Care Information Centre, UK. Available at: <https://digital.nhs.uk/data-and-information/publications/statistical/prescriptions-dispensed-in-the-community/prescriptions-dispensed-in-the-community-england-2007-2017>.
- Quintão, F.J.O., Freitas, J.R.L., de Fátima Machado, C., Aquino, S.F., de Queiroz Silva, S., de Cássia Franco Afonso, R.J., 2016. Characterization of metformin by-products under photolysis, photocatalysis, ozonation and chlorination by high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectr.* 30 (21), 2360–2368.
- Shraim, A., Diab, A., Alshaimi, A., Niaz, E., Metwally, M., Amad, M., Dawoud, A., 2017. Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. *Arabian J. Chem.* 10, 5719–5729.
- Socialstyrelsen, 2018. Statistics Database for Drugs. Available at: <http://www.socialstyrelsen.se/statistik/statistikdatabas/lakemedel>.
- Sundhedsdata-Styrelsen, 2018. Medstat.dk. Available at: <http://www.medstat.dk/en>.
- Ter Laak, T., Baken, K., 2014. The Occurrence, Fate and Ecological and Human Health Risks of Metformin and Guanlyurea in the Water Cycle—A Literature Review. KWR, Watercycle Research Institute, Nieuwegein, Netherlands.
- Thomaidi, V.S., Stasinakis, A.S., Borova, V.L., Thomaidis, N.S., 2016. Assessing the risk associated with the presence of emerging organic contaminants in sludge-amended soil: a country-level analysis. *Sci. Total Environ.* 548, 280–288.
- Tisler, S., Zwiener, C., 2018. Formation and occurrence of transformation products of metformin in wastewater and surface water. *Sci. Total Environ.* 628, 1121–1129.
- Tisler, S., Zwiener, C., 2019. Aerobic and anaerobic formation and biodegradation of guanlyurea and other transformation products of metformin. *Water Res.* 149, 130–135.
- Trautwein, C., Berset, J.D., Wolschke, H., Kümmerer, K., 2014. Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanlyurea in several compartments of the aquatic cycle. *Environ. Int.* 70, 203–212.
- Ussery, E., Bridges, K.N., Pandelides, Z., Kirkwood, A.E., Bonetta, D., Venables, B.J., Holdway, D., 2018. Effects of environmentally relevant metformin exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 205, 58–65.

- Ussery, E., Bridges, K.N., Pandeides, Z., Kirkwood, A.E., Guchardi, J., Holdway, D., 2019. Developmental and full-life cycle exposures to guanlyurea, and guanlyurea-metformin mixtures results in adverse effects on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 38 (5), 1023–1028.
- Weissinger, R.H., Blackwell, B.R., Keteles, K., Battaglin, W.A., Bradley, P.M., 2018. Bioactive contaminants of emerging concern in National Park waters of the northern Colorado Plateau, USA. *Sci. Total Environ.* 636, 910–918.
- Xing, Y., Yu, Y., Men, Y., 2018. Emerging investigators series: Occurrence and fate of emerging organic contaminants in wastewater treatment plants with an enhanced nitrification step. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 4 (10), 1412–1426.
- Yan, J.H., Xiao, Y., Tan, D.Q., Shao, X.T., Zheng, Q.D., Pei, W., Wang, D.G., 2019. Wastewater analysis reveals spatial pattern in consumption of anti-diabetes drug metformin in China. *Chemosphere* 222, 688–695.
- Yang, P.K., Hsu, C.Y., Chen, M.J., Lai, M.Y., Li, Z.R., Chen, C.H., Ho, H.N., 2018. The efficacy of 24-month metformin for improving menses, hormones, and metabolic profiles in polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 103 (3), 890–899.
- Yao, B., Yan, S., Lian, L., Yang, X., Wan, C., Dong, H., Song, W., 2018. Occurrence and indicators of pharmaceuticals in Chinese streams: a nationwide study. *Environ. Pollut.* 236, 889–898.
- Yeh, A., Marcinek, D.J., Meador, J.P., Gallagher, E.P., 2017. Effect of contaminants of emerging concern on liver mitochondrial function in Chinook salmon. *Aquat. Toxicol.* 190, 21–31.
- Zhu, S., Liu, Y.G., Liu, S.B., Zeng, G.M., Jiang, L.H., Tan, X.F., Yang, C.P., 2017. Adsorption of emerging contaminant metformin using graphene oxide. *Chemosphere* 179, 20–28.
- Zorginstituut Nederland, 2018. *GIP Database*. Available at: https://www.gipdatabank.nl/databank#/g/85_dia/vs/bijlage.

2. Artículo de investigación metformina

Chemosphere 285 (2021) 131213



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

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



Antidiabetic drug metformin disrupts the embryogenesis in zebrafish through an oxidative stress mechanism

Gustavo Axel Elizalde-Velázquez^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a,*}, Sandra García-Medina^b, Hariz Islas-Flores^a, María Dolores Hernández-Navarro^b, Marcela Galar-Martínez^a

^a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tolloccan, Colonia Residencial Colón, CP 50120, Toluca, Estado de México

^b Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu s/n y Cerrada Manuel Stampa, Col. Industrial Vallejo, Ciudad de México, CP, 07700, Mexico

ARTICLE INFO

Handling Editor: James Lazorchak

Keywords:

Antidiabetic drug
Metformin
Oxidative stress
Teratogenesis
Embryotoxicity

ABSTRACT

In recent years, the consumption of metformin has increased not only due to the higher prevalence of type 2 diabetes, but also due to their usage for other indications such as cancer and polycystic ovary syndrome. Consequently, metformin is currently among the highest drug by weight released into the aquatic environments. Since the toxic effects of this drug on aquatic species has been scarcely explored, the aim of this work was to investigate the influence of metformin on the development and redox balance of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. For this purpose, zebrafish embryos (4 hpf) were exposed to 1, 10, 20, 30, 40, 50, 75 and 100 µg/L metformin until 96 hpf. Metformin significantly accelerated the hatching process in all exposure groups. Moreover, this drug induced several morphological alterations on the embryos, affecting their integrity and consequently leading to their death. The most frequent malformations found on the embryos included malformation of tail, scoliosis, pericardial edema and yolk deformation. Regarding oxidative balance, metformin significantly induced the activity of antioxidant enzymes and the levels of oxidative damage biomarkers. However, our IBR analysis demonstrated that oxidative damage biomarkers got more influence over the embryos. Together these results demonstrated that metformin may affect the embryonic development of zebrafish and that oxidative stress may be involved in the generation of this embryotoxic process.

1. Introduction

Metformin (MET) is the most common drug prescribed to treat type 2 diabetes. Nonetheless, in recent years, numerous studies have suggested its usage for other indications such as: polycystic ovary syndrome and cancer (Zaidi et al., 2019; Bahrambeigi et al., 2020; Guan et al., 2020). In consequence, the prescriptions and consumption of this drug are increasing worldwide, leading to its presence in wastewater treatment plants (WWTPs). Once in WWTPs, MET is partially bio-transformed to guanilylurea (GUA), and both compounds are released in to the aquatic environments, where they can exhibit different toxic effects in non-target organisms (Elizalde-Velázquez and Gómez-Oliván, 2020). The concentration of MET in worldwide water bodies ranges from ng/L to µg/L, with up to 33.5 µg/L detected in surface water (Elliot et al., 2017; Yao et al., 2018; Posselt et al., 2018).

Among the toxic effects that MET may induce in aquatic species are

endocrine disruption and intersexuality. Niemuth et al. (2015), for instance demonstrated that 40 µg/L of this drug induced the over-expression of vitellogenin (VTG) in fathead minnow (FHM) males. Similarly, Crago et al. (2016) observed impacts on expression of VTG, estrogen receptor α (ER α) and gonadotropin releasing hormone 3 (GnRH3) in juvenile FHM at concentrations as low as 1 µg/L. In agreement with these results, Lee et al. (2019) pointed out that MET could activate AMPK by inhibiting MRC 1 and thereby affects the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis, resulting in reproductive system disturbance.

Another harmful response that MET may produce in aquatic species is metabolic dysregulation. Brown trout embryos exposed to several concentrations of this drug (1 µg/L – 1 000 µg/L) showed an increase in the amount of hepatic glycogen, especially in fish exposed the lowest MET concentration (Jacob et al., 2018). Analogously, early life stages of Japanese medaka exposed to a range of relevant concentrations of MET

* Corresponding author.

E-mail addresses: lmgomezo@uaemex.mx, lgolivan74@gmail.com (L.M. Gómez-Oliván).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131213>

Received 11 May 2021; Received in revised form 4 June 2021; Accepted 10 June 2021

Available online 7 July 2021

0045-6535/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(1 µg/L – 100 µg/L) had significantly altered metabolomes (Ussery et al., 2018). Changes in metabolite response factors and gene expression may indicate the cellular pathways affected by the presence of pollutants. In this case, MET mainly affected metabolites associated with cellular energetic and cell proliferation/growth pathways.

Regarding embryonic development toxic responses, only three studies have been carried out in fish. In the first one, environmentally relevant concentrations of MET (1 µg/L – 100 µg/L) significantly reduced growth metrics and altered the expression of genes associated with cell growth (Ussery et al., 2018). According to the authors, their results may provide evidence that current environmental exposure scenarios may be sufficient to cause effects on developing fish. In disagreement with these results, Jacob et al. (2018) pointed out that mortality and development of brown trout embryos (48 dpf) were not influenced, after MET exposure (1 µg/L – 1000 µg/L). Nonetheless, they suggested that other species could react more sensitively to MET. Finally, this year, Parrot et al. (2021) investigated the chronic effects of environmentally relevant concentrations of MET (0.020 µg/L – 269 µg/L) in early life stages of fathead minnows. In their results, MET did not affect survival or growth of larval fish.

In order to fill the current knowledge gaps about the embryotoxicity effects that MET may induce in aquatic species, we carried out a study in zebrafish embryos. Our hypothesis is that environmentally relevant concentrations of MET would be capable of disrupt the embryonic development of this freshwater organism, through an oxidative stress mechanism.

2. Methods

2.1. Ethical approval

This research protocol was reviewed and approved by the Ethics and Research Committee of the Autonomous University of the State of Mexico (UAEM) to ensure that experiments are conducted in accordance with institutional standards for animal care (approval ID: RP. UAEM. ERC.132.2020). The provisions of the Mexican official standard on the breeding, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO- 1999) were also taken into account.

2.2. Compounds

Metformin hydrochloride (CAS number: 1115-70-4) was purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON). Stock solutions of MET were prepared at a concentration of 1 g/L in ultrapure water.

Likewise, all other reagents were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise indicated.

2.3. Zebrafish maintenance

Wild-type (AB strain) zebrafish embryos, were maintained at the Autonomous University of State of Mexico (Toluca, Mexico) in an open water system supplied with aerated, dechlorinated, charcoal-filtered and UV-sterilized tap water. Feeding was performed three times a day with *Spirulina* flakes (Ocean Nutrition, US) supplemented with brine shrimp (*Artemia* sp. *nauplii*) to promote spawning activity. Water quality parameters are shown in Table 1. All parameters were monitored and controlled during zebrafish maintenance and breeding, as well as during subsequent experiments.

2.4. Zebrafish embryo collection

At the night before spawning, several males and females adults of zebrafish (2:1 ratio) with size 4–5 cm were chosen, and placed on individual breeding chambers. The spawning was induced by the onset of light in the morning. Embryos were collected, at 1 h post-fertilization (hpf), rinsed in embryo water and bleached according to established

Table 1

Water quality parameters.

Parameter	Value ± SD
pH	7.35 ± 0.15
Hardness	95 ± 5 mg/L CaCO ₃
Un-ionized ammonia	0.009 ± 0.003 mg/L
Alkalinity	95 ± 5 mg/L CaCO ₃
Nitrate (NO ₃ ⁻)	3.1 ± 0.2 mg/L
Nitrite (NO ₂ ⁻)	0.030 ± 0.010 mg/L
Dissolved Oxygen	10.5 ± 0.5 mg/L
Conductivity	390 ± 35 µS/cm
Salinity	0.7 ± 0.2 g/L

Data represents the medium values of all replicates from all experiments ± SD.

protocols (Westerfield, 2007; Varga, 2011). Fertilized embryos were classified under a stereoscopic microscope according to standard methods (Kimmel et al., 1995) and middle blastula stage embryos (equivalent to 2.5 hpf) were selected. After the selection, middle blastula stage embryos were kept in an incubator (27 °C ± 1 °C) and left in the ultrapure water until embryos reached sphere stage (4 hpf). In Fig. 1A, we have depicted the general scheme of the procedure, and we included.

2.5. Zebrafish embryo toxicity test

Seventy two embryos at the sphere stage (4 hpf) were selected and randomly distributed into 24-well plates (1 embryo per well). Each plate contained either a control solution (ultrapure water) or a test solution of MET (1, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 µg/L). Three 24-well plates were used per test solution of MET as is shown in Fig. 1B. Furthermore, the exposure of embryos to each test solution of MET was carried out per triplicate, in three independent experiments to guarantee the reproducibility of results. The concentrations used on this experiments were based on pre-experiments (Elizalde-Velázquez and Gómez-Oliván, 2020). Sample size was calculated according to the OECD 236 Guidelines, which indicate to perform the test in 24-well plates. Furthermore, in this study, we opted to use three 24-well plates per treatment to guarantee statistical significance. In order to minimize the biases in this research, we considered the following points: 1) the main researcher of this research would know the treatments at which embryos were exposed; 2) one lab technician would be in charge of preparing the test solutions and the maintenance of the systems; and 3) another lab technician would be in charge of the randomization process. This way, lab technicians were blinded to treatment during systems maintenance, while researchers were blinded to treatment during randomization. Randomization was carried out as follows. Total of embryos were divided in 9 groups (72 embryos per group) that represented the control solution and each of the test solutions of MET. Next, all groups were assigned with a number from 1 to 9 using the standard = INT (RAND () function in Microsoft Excel. This way, numbers represented the treatment at which embryos were exposed. Plates were maintained at 27 °C ± 1 °C, and under same light/dark periods (14:10). Lab technicians were blinded to treatment during systems maintenance, while researchers were blinded to treatment during randomization. Embryo mortality, hatching rate and malformation rate were assessed at different times (12, 24, 48, 72 and 96 hpf) during the course of MET exposure. Malformation rate was given as the percentage of embryos with at least one malformation with regard to the control. A graphic with the principal body alterations induced by MET exposure on embryos of *Danio rerio* was created using IBM SPSS Statistics 22 software. Mortality of embryos was also evaluated using a stereoscopic microscope, and dead embryos were removed daily. At the end of exposure time (96 hpf), live dead and malformed embryos were counted and a maximum likelihood linear regression analysis was done to determine LC₅₀ and EC_{50m} with their 95% confidence intervals (p < 0.05). Spearman-Kärber method trimmed was used (US-EPA software ver 1.5). In order to depict the cumulative

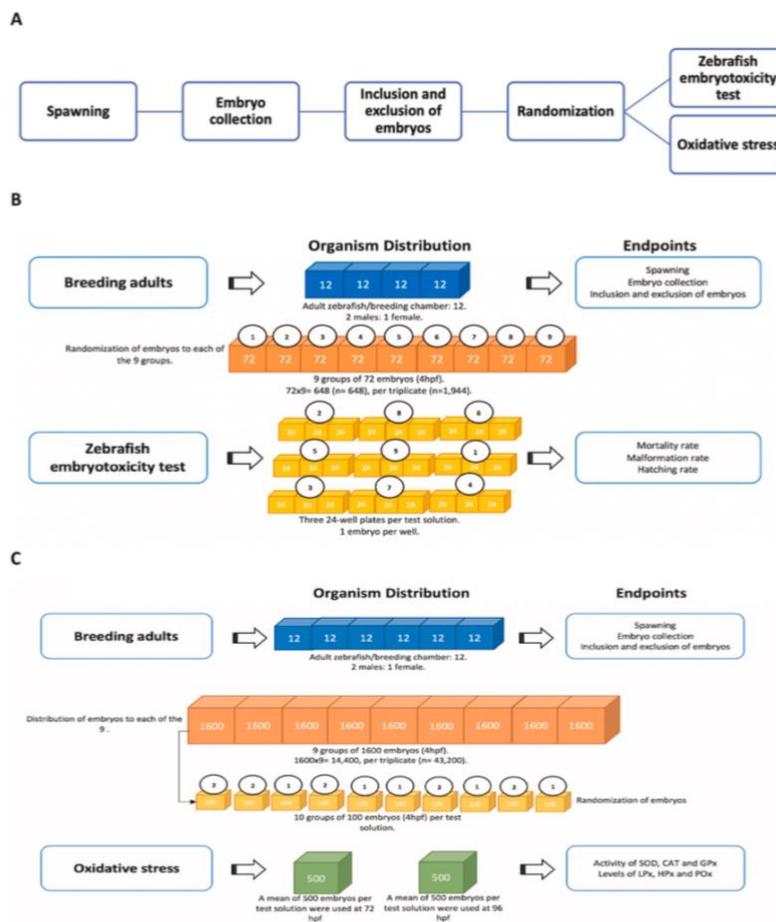


Fig. 1. Experimental design. A general scheme of the procedure B zebrafish embryo toxicity test procedure C oxidative stress procedure.

mortality rate of the embryos at 12, 24, 48, 72 and 96 hpf, we performed a Kaplan-Meier analysis, using the SigmaPlot 12.3 software.

2.6. Oxidative stress in zebrafish embryos

Nine systems, each with 1600 *Danio rerio* at the sphere stage, were formed in aquariums of 4 L capacity. From these, eight were exposed to every MET concentrations and the last one was exposed to the control solution as is shown in Fig. 1C. Sample size was established based on pre-experiments (Nogueira et al., 2019). Briefly, for enzymatic determinations, they used a total of 700 unhatched zebrafish embryos at the beginning of each exposure. Here, we opted to use 800 embryos considering the high rates of mortality reached by MET during the fish embryotoxicity test. Furthermore, in this study we duplicate the number of embryos due to samples were taken up at 72 hpf and 96 hpf. These endpoint times were selected because at that time the zebrafish embryos had already hatched and their enzymatic system was already working. All along the exposure period, temperature ($27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and light/dark

cycles (14:10) were kept constant in all the systems. For sampling, a mean of 500 embryos were randomly selected at 72 hpf and 96 hpf, and homogenized in 1 mL of phosphate buffer solution (pH 7.4). In order to minimize the biases in this research, we considered the following points: 1) the main researcher of this research would know the treatments at which embryos were exposed; 2) one lab technician would be in charge of preparing the test solutions and the maintenance of the systems; and 3) another lab technician would be in charge of the randomization process. This way, lab technicians were blinded to treatment during systems maintenance, while researchers were blinded to treatment during randomization. Randomization was performed as follows. Embryos from each system were divided into 10 groups (a mean of 100 embryos per group), and groups were assigned with a number between 1 and 2 using the standard = INT (RAND () function in Microsoft Excel. This way, 1 represents the groups that were used at 72 hpf, while 2 symbolizes the groups used at 96 hpf. Lab technicians were blinded to treatment during systems maintenance, while researchers were blinded to treatment during randomization. Samples were separated in two

Eppendorf tubes. On one hand, tube 1 contained 300 µL from the homogenate and 300 µL of a solution of trichloroacetic acid (TCA, 20%). On the other hand, tube 2 contained 700 µL from the homogenate. All tubes were maintained at -20 °C until they were used. Tube 1 was centrifuged at 11 495 rpm for 15 min at 4 °C and the precipitate was used to assess the protein carbonyl content (POx), while the supernatant was used to measure the levels of lipid peroxidation (LPX) and the hydroperoxide content (HPx). Tube 2 was centrifuged at 12 500 rpm for 15 min at 4 °C and the supernatant was used to determine the activity of antioxidant enzymes: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx).

Oxidative damage biomarkers and antioxidant enzymes activity were determined by different methods. The thiobarbituric acid assay for instance, was used to determine the LPX levels on fish (Buege and Aust, 1978). Analogously, the determination of POx was carried out by the method of Levine et al. (1994), which is centered on the reaction of the carbonyl groups with 2,4-dinitrophenylhydrazine. In addition, for the quantification of HPx, we used the ferrous oxidation-xyleneol assay described by Jiang et al. (1992).

Regarding antioxidant enzymes, CAT was evaluated by the method of Radi et al. (1991) based on the consumption of exogenous H₂O₂. For SOD determination, we used the enzymatic assay of Misra and Fridovich (1972) that measure the ability of SOD to inhibit the autooxidation of epinephrine at pH 10.2. Finally, the method of Gunzler and Flohe-Clairborne (1985) was used to assess the GPx activity, based on the net reduction of glutathione S-transferase in 1 min at 37°C and pH 7.

Results from all biomarkers were normalized against total proteins, which were analyzed with the method of Bradford (1976). Furthermore, the experiments were replicated three times.

2.7. Metformin determination

For the zebrafish embryo toxicity test, water samples from all of the seventy two wells for each treatment group were collected and stored at -20 °C until their quantification. Similarly, for the oxidative stress test, water samples from each of the nine systems were collected and stored at -20 °C until their quantification. Water samples for both studies were taken up at 0 time, as well as at 12, 24, 48 and 96 hpf. MET determination in water samples was performed on an Agilent 1260 HPLC system coupled to an API 5500 Qtrap MS equipped with a Turbo V Ion spray source. Positive ESI parameters were optimized to the following conditions: nebulizer gas 310 kPa; turbo gas 448 kPa; ion spray voltage 4.5 kV; collision gas: medium; curtain gas 172 kPa; and a ion source temperature 550 °C. >98% nitrogen was used as deolvation nebulizer and collision gas. Instrument control, data acquisition and data processing were performed with Analyst 1.6 software. Separation was performed using a Xbridge Phenyl column (150 mm × 2.1 mm, particle size 3.5 µm). The mobile phase consisted of a mixture of water with 5 mM ammonium formate as eluent A and MeOH 100% with 5 mM ammonium formate as eluent B. The flow rate was of 100 µL/min and the injection volume was of 50 µL.

2.8. Integrated biomarker response index (IBR)

Oxidative stress results were applied into the "Integrated Biomarker Response (IBR) Index" described by Sanchez et al. (2013). This tool can be used to integrate multi-biomarker responses (Sanchez et al., 2013). For the IBR calculation, all biomarkers from each treatment group (Xi) were compared to biomarkers of the control group (Xo). The ratio between Xi and Xo was log transformed (Yi) to reduce variance. Next, Yi values were standardized applying the following formula $Z_i = (Y_i - \mu) / s$ and using the mean (μ) and standard deviation (s) of Yi. Thereafter, the biomarker deviation index (A) were calculated thought the difference between Zi and Z0. Finally, A values were pictured in a star plot that represents the integrate biomarker responses. Furthermore, the absolute value of A from each biomarker was summed to get the IBR values.

2.9. Statistical analysis

Once all endpoints were evaluated, results were analyzed by a researcher who did not know the treatment at which embryos were exposed. Results, from all three replicates of each experiment were pooled and evaluated as follow: Oxidative stress biomarkers data was examined using a two-way analysis of variance (ANOVA), considering time as factor A and concentration as factor B. Additionally, variations between the means were examined with the Student-Newman-Keuls method, using SigPlot 12.3 software. All oxidative stress biomarkers passed the normality test, excluding LPX. Thus, we opted to use a dot plot to show the distribution of data of this biomarker. This graphic was done in StatGraphic Centurion 16.02.04 and an ANOVA non-parametric was also carried out. Please head over supplementary material to see this graphic (Fig. 1S). Embryotoxic and teratogenic effects data were evaluated by Fisher's exact test. Significance was accepted when $p < 0.05$, using SigPlot 12.3 software. Statistical analysis was blinded to researchers.

3. Results

3.1. Mortality test

The cumulative mortality rate of zebrafish embryos exposed to each MET concentration is showed in Fig. 2A. When compared with the control group, MET significantly increased the mortality rate in zebrafish embryos in a time and concentration dependent manner, reaching the highest number of dead embryos at the concentration of 75 µg/L. Although, for the concentration of 100 µg/L, the mortality rate was significantly higher than the controls, this was much lower than in the rest of the concentrations. As same as in mortality rate, MET considerably increased the malformation rate, reaching the maximum peak at the concentration of 75 µg/L (Fig. 2B). After this concentration, MET showed an important decrease in the number of malformed embryos. Taking into account this data, LC₅₀ and EC_{50m} were calculated, getting a value of 3.25 µg/L and 0.37 µg/L, respectively. Furthermore, the teratogenic index of MET in *Danio rerio* got a value of 8.8. According to the criteria of Weigt et al. (2011), MET should be classified as teratogenic.

3.2. Hatching rate

Hatching rates of zebrafish embryos exposed to MET and ultrapure water are depicted in Fig. 2C. As can be seen from this figure, at 24 hpf, embryos exposed to 10 µg/L, 20 µg/L and 30 µg/L of MET started to emerge from chorion. However, this process was only found to be statistically significant for 10 µg/L and 20 µg/L dose of MET. At 48 hpf, the hatching rate for all exposure groups was significantly increased compared with the control group. The highest number of embryos dechorionated was obtained for the concentration of 75 µg/L of MET. Furthermore, at the concentration of 100 µg/L, the hatching rate notably decreased compared with the rest of the treatment groups. 24 h later, most of the embryos of the control group and the MET treated group had hatched. At this moment, none of the treatment groups showed a significant difference compared with the control group. Finally, at 96 hpf, all of the embryos from the control and treatment groups had hatched.

3.3. Teratogenic effects induced by MET

During all the exposure period, development of the embryos in the control group was normal. Unlike control group, MET caused body malformations in all treatment groups and exposure time (Fig. 3A). The observed malformations included malformation of tail, scoliosis, pericardial edema, yolk deformation, hypopigmentation, delay of the hatching process, fin absent, eye absent and craniofacial malformation. Among these, the most pronounced malformations were malformation of tail and scoliosis (Fig. 3B). As can be seen in Fig. 3, the sternness of

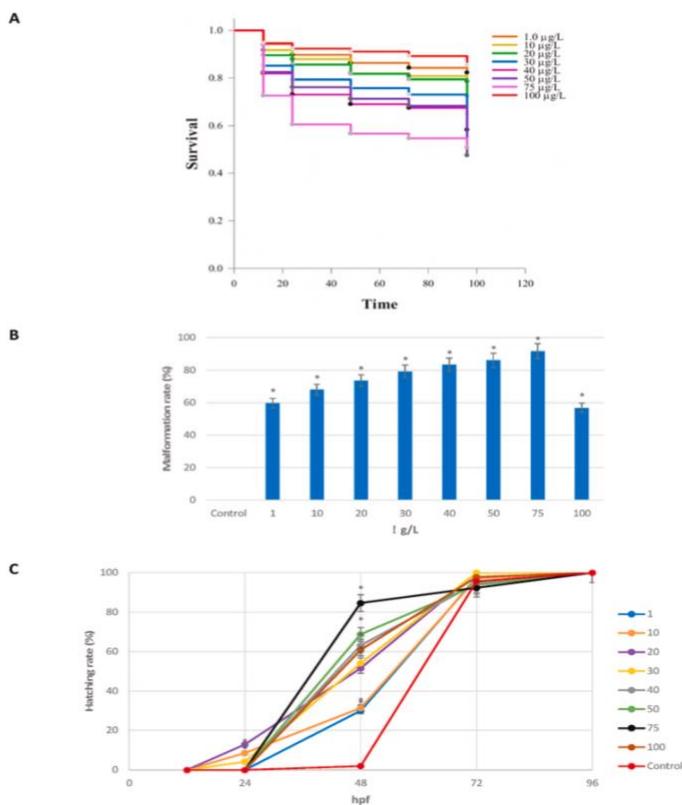


Fig. 2. Mortality, malformations and hatching rate in *Danio rerio* embryos exposed to MET ($\mu\text{g/L}$). **A** represents the cumulative mortality rate of zebrafish embryos exposed to each MET concentration at 12,24,48,72 and 96 hpf. **B** represents the cumulative malformations rate of zebrafish embryos exposed to each MET concentration at 96 hpf. **C** represents the cumulative hatching rate of zebrafish embryos exposed to each MET concentration at 12, 24, 48, 72 and 96 hpf. Data are expressed as means \pm standard error (SEM) from three independent experiments. * denote a significant change with $P < 0.05$.

malformations was more evident as concentration increase, showing a higher incidence of embryos with pericardial edema, yolk deformation, eye absent and craniofacial malformation. The most severe malformations were observed for the embryos exposed to 75 $\mu\text{g/L}$. After this concentration, MET showed a significant decrease in the severity of malformations.

3.4. Antioxidant activity induced by MET

The antioxidant activity of SOD, CAT and GPx, in *Danio rerio* embryos exposed to MET is depicted in Fig. 4. As can be seen in this figure, the activity of all enzymes, in all exposure groups, showed a significant increase compared with control group. Furthermore, as the concentration increased, the activity of the enzymes also increased, reaching the maximum peak at the concentration of 75 $\mu\text{g/L}$. After this concentration, the activity of all enzymes significantly declined compared with rest of the treatment groups. Regarding exposure time, no significant differences were found in the activity of SOD. Nonetheless, at the concentration of 50 $\mu\text{g/L}$, the enzymatic activity of CAT showed a significant increase at 96 hpf compared to 72 hpf. Moreover, the enzymatic activity of GPx was significantly increased at the concentrations of 40 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$ and 75 $\mu\text{g/L}$ in a time dependent manner.

3.5. Oxidative damage induced by MET

The levels of LPX, HPx and POx in *Danio rerio* embryos exposed to MET are shown in Fig. 5. As same as in the antioxidant enzymes, the levels of all oxidative damage biomarkers, in all exposure groups, exhibited a significant increase compared with the control group. Additionally, the levels of all oxidative damage biomarkers increased as the concentration did, reaching the highest peak at a dose of 75 $\mu\text{g/L}$ of MET. On the other hand, at a concentration of 100 $\mu\text{g/L}$, the levels of LPX, HPx and POx considerably decreased compared with the rest of the treatment groups. Regarding exposure time, the levels of LPX and HPx significantly increased at the concentrations of 50 $\mu\text{g/L}$ and 75 $\mu\text{g/L}$. However, no differences were found in the levels of POx at 96 hpf compared to 72 hpf.

3.6. IBR

IBR values increased as MET concentrations increased, indicating that high concentrations of this drug induced more pronounced effects in the embryos, with the exception of the 100 $\mu\text{g/L}$ concentration (Fig. 6). These effects were mainly focused on oxidative damage as the star plot was mainly deviated to these biomarkers. At the lowest concentration, for instance the oxidative damage biomarker that more impacted the embryos was POx. Nonetheless, as the concentrations

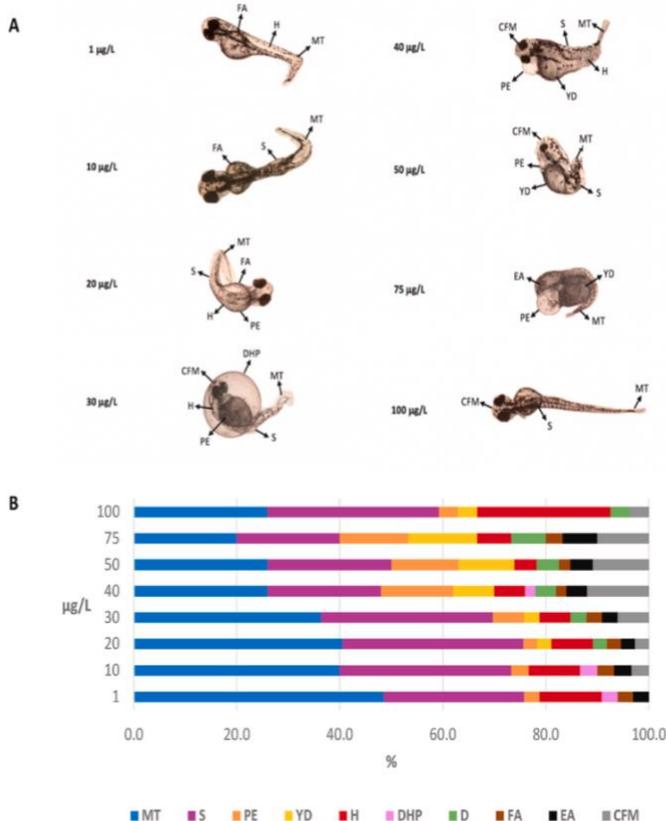


Fig. 3. Main malformations induced by each concentration of MET in *Danio rerio* embryos. **A** Representative photos of morphological abnormalities in zebrafish embryos exposed to environmentally relevant concentrations of MET at 96 hpf. Arrows indicate all malformations found on each embryo. **B** Cumulative incidence of each malformation found in zebrafish embryos exposed to MET, expressed in percentage. Data are expressed as means \pm standard error (SEM) from three independent experiments. MT: malformation of tail; S: scoliosis; PE: pericardial edema; YD: yolk deformation; H: hypopigmentation; DHP: delay of the hatching process; FA: fin absent; EA: eye absent; CFM: craniofacial malformation.

increased, the HPx and LPx biomarkers got more influence over the embryo. Regarding exposure time, the concentration of 50 µg/L and 75 µg/L showed a significant increase in the mean IBR values.

3.7. Metformin determination

For both test, MET concentrations in water samples was in accordance with the nominal MET concentrations (Table 2 and Table 3). Since the concentration of MET was maintained above 80% for all samples, analyses of the results were based on nominal values.

4. Discussion

In the present study, the harmful effects of the antidiabetic drug MET on the embryonic development of *Danio rerio* were investigated. Our results demonstrated that environmentally relevant concentrations of MET may increase the mortality and malformation rate in zebrafish embryos. Nonetheless, these results are not in agreement with those found by Jacob et al. (2018), who pointed out that MET concentrations from 1 µg/L to 1000 µg/L did not affect the mortality rate of brown trout embryos. Differences between studies may be explained due to the dissimilar incubation temperatures. Brown trout embryos, for instance were incubated at 7 °C and 11 °C, while zebrafish embryos were kept in

climate chambers at 27 °C. This is noteworthy, as Jacob et al. (2018) found higher concentrations of MET in brown trout embryos exposed to 11 °C compared to the lower temperature. Thus, it is suggested that temperature may enhance the uptake of this drug. Another factor that may influence the results of both studies are the differences in the stages of embryonic development. For example, in our study, zebrafish embryos exposed to MET were at the sphere stage (4 hpf), while brown trout embryos exposed to this drug were in the eyed stage (48 dpf). It is well known that as time passes the structure of chorion change and the toughness of the embryo membrane begins to raise, leading to a low permeability. Ussery et al. (2018), for instance demonstrated that Japanese medaka embryos exposed to 10 µg/L of ¹⁴C-MET prior to hardening (<6 hpf) had significantly more ¹⁴C-MET relative to embryos exposed to this compound post-chorion hardening (24 hpf). Since the embryonic development of Japanese medaka and zebrafish are comparable (Furutani-Seikia and Wittbrod, 2004), we suggest MET had a similar uptake behavior in zebrafish. Therefore, MET could be easily absorbed by zebrafish at sphere stage, but no in brown trout in eyed stage, leading to a different toxic response, with the latter being more severe in zebrafish.

Interestingly, MET not only increased the mortality and malformations rate of zebrafish, but also accelerate the hatching process in fish. These findings are consistent with those reported by Flores et al. (2020),

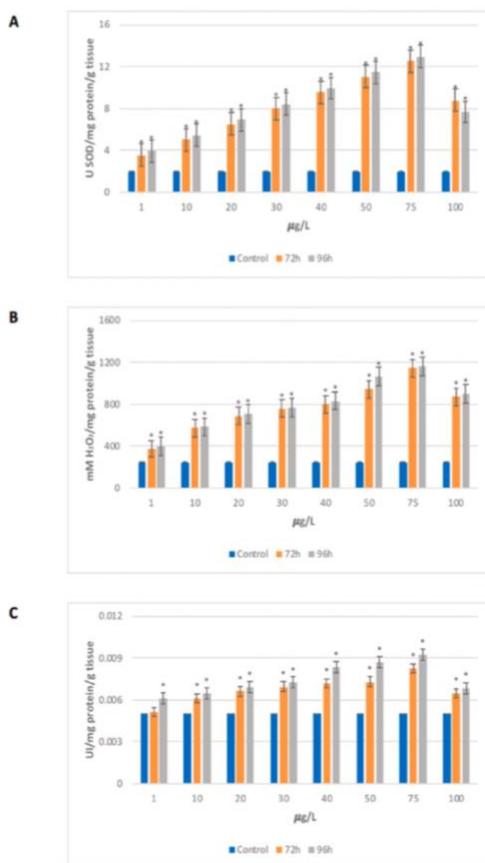


Fig. 4. Activity of antioxidant enzymes, SOD (F (8,144) = 6797.101; n = 9; p < 0.001) A, CAT (F (8,144) = 630.279; n = 9; p < 0.001) B and GPx (F (8,144) = 56.674; n = 9; p < 0.001) C, in *Danio rerio* embryos exposed to MET at 72 hpf and 96 hpf. Data are expressed as the mean of three replicates \pm standard error (SEM). * indicate a significant change with P < 0.05.

who demonstrated that MET induced an anticipated hatching (48 hpf) in zebrafish embryos exposed to several concentrations (10 $\mu\text{g/L}$ –2000000 $\mu\text{g/L}$) of this drug. Analogously, in a randomized comparative study, Rowan et al. (2008) exhibited the rates of spontaneous and iatrogenic preterm births were higher in women treated with metformin than those with insulin. Anticipated hatching in fish is important as hatched fish are more vulnerable to predators, mechanical and osmotic stress, and toxic agents present in the water bodies, leading to more severe alterations in its development. Hatching alterations in fish can be induced by several endogenous and exogenous factors, including toxic agents, oxygen availability, central nervous system chemical modulators, release of proteolytic enzymes and hormonal levels (De la Paz et al., 2017). Nonetheless the mechanisms and pathways involved has not been completely elucidated. Since previous studies have demonstrated that MET may be an endocrine disruptor (Niemuth and Kapler, 2015; Lee, 2017; Monshi, 2017; Niemuth et al., 2018; Lee et al., 2019), it could be suggested that the hormonal disturbances on fish might be involved in

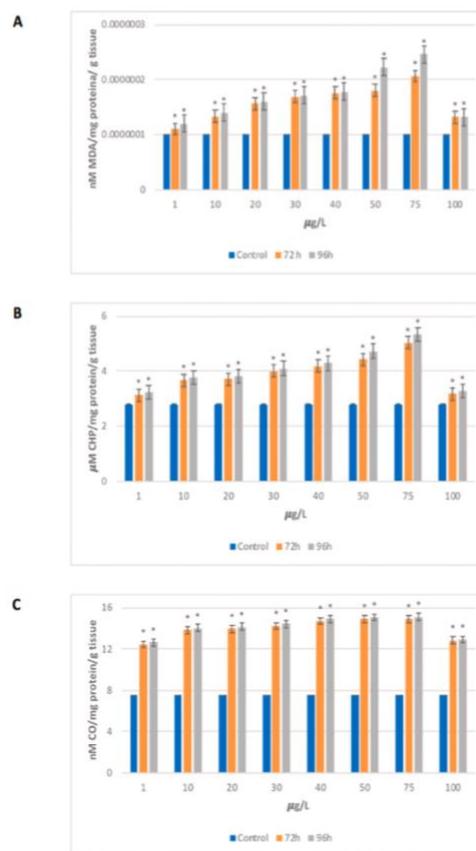


Fig. 5. Levels of LPX (F (8,144) = 467.969; n = 9; p < 0.001) A, HPx (F (8,144) = 243.986; n = 9; p < 0.001) B and POx (F (8,144) = 92.710; n = 9; p < 0.001) C, in *Danio rerio* embryos exposed to MET at 72 hpf and 96 hpf. Data are expressed as the mean of three replicates \pm standard error (SEM). * indicate a significant change with P < 0.05.

the accelerate hatching process. Nevertheless, future studies should elucidate the mechanism by which this drug may alter the hatching process of fish.

During all the exposure period, MET induced several malformations on zebrafish embryos. Among these, it is included malformation of tail, scoliosis, pericardial edema, yolk deformation, hypopigmentation, fin absent, eye absent and craniofacial malformation. In agreement with these results, a study carried out in chick embryo showed that multiple concentrations (0.1 mg/ml - 5 mg/ml) of MET displayed a delay in closure of anterior and posterior neuropores, leading to brain abnormalities, absence of limb buds, as well as a delay in the eye, otocyst, heart, branchial and somites formation (Siripattanaphol et al., 2020). Furthermore, Flores et al. (2020) pointed out that MET may cause microcephaly and decreased tail length in zebrafish embryos exposed to multiple concentrations (10 $\mu\text{g/L}$ - 2000000 $\mu\text{g/L}$) of MET. One possible mechanism through which MET may induce these malformations on fish may be oxidative stress. As it is known, reactive oxygen species (ROS)

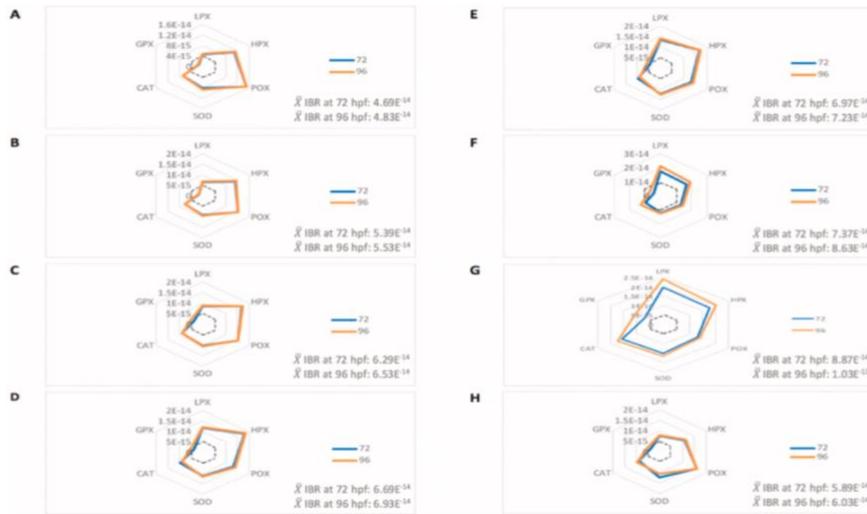


Fig. 6. IBR values and star plots of oxidative stress response of *Danio rerio* embryos exposed to MET. Biomarkers from each treatment groups (colors lines) were compared to those of the control group (dashed line). The area above zero indicate the production of the biomarker and under zero reflects the reduction of the biomarker. Letters (A–H) represent each of the MET concentrations tested in this study, arranged from the lowest to the highest. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 2
Measured concentrations of MET in the zebrafish embryo toxicity test.

Nominal concentrations of MET	Measured MET concentrations at different exposure times ($\mu\text{g/L}$)					
	0 hpf	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Control	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ
1 $\mu\text{g/L}$	0.98 \pm 0.03	0.89 \pm 0.02	0.89 \pm 0.02	0.88 \pm 0.02	0.88 \pm 0.01	0.87 \pm 0.01
10 $\mu\text{g/L}$	9.97 \pm 0.06	9.05 \pm 0.05	9.01 \pm 0.04	8.99 \pm 0.04	8.92 \pm 0.05	8.85 \pm 0.04
20 $\mu\text{g/L}$	19.93 \pm 0.12	18.21 \pm 0.09	18.07 \pm 0.10	17.92 \pm 0.10	17.77 \pm 0.10	17.61 \pm 0.09
30 $\mu\text{g/L}$	30.11 \pm 0.21	28.54 \pm 0.19	28.10 \pm 0.17	27.63 \pm 0.15	27.35 \pm 0.15	27.02 \pm 0.16
40 $\mu\text{g/L}$	40.02 \pm 0.50	37.33 \pm 0.43	37.01 \pm 0.40	36.95 \pm 0.42	36.81 \pm 0.40	36.77 \pm 0.42
50 $\mu\text{g/L}$	50.05 \pm 0.64	48.20 \pm 0.58	47.34 \pm 0.60	47.01 \pm 0.61	46.73 \pm 0.59	46.48 \pm 0.62
75 $\mu\text{g/L}$	75.01 \pm 0.73	72.20 \pm 0.70	71.83 \pm 0.69	71.04 \pm 0.70	70.42 \pm 0.69	69.90 \pm 0.71
100 $\mu\text{g/L}$	100.45 \pm 0.91	96.02 \pm 0.85	95.18 \pm 0.83	94.31 \pm 0.84	92.83 \pm 0.80	91.60 \pm 0.82

Values represent mean \pm standard deviation of each concentration. LoQ: limit of quantification (500 ng/L).

act as a primary and secondary messengers to induce the cell growth or death. Furthermore, redox system control different transcriptions factors that regulate cell signaling pathways involved in proliferation, differentiation and apoptosis (Pasková et al., 2011). Therefore, oxidative stress may disrupt several important reactions that affect the development of the embryos. Here, we demonstrated that after an acute exposure to MET on early life stages of zebrafish, this drug may induce an oxidative stress response on the embryos. Furthermore, our IBR analyses indicated that as MET concentrations increased, mean IBR values also increased. Therefore, oxidative stress responses in the organisms were more pronounced as the concentration increased. In agreement

Table 3
Measured concentrations of MET in the oxidative stress test.

Nominal concentrations of MET	Measured MET concentrations at different exposure times ($\mu\text{g/L}$)					
	0 hpf	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Control	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ
1 $\mu\text{g/L}$	1.01 \pm 0.01	0.91 \pm 0.01	0.90 \pm 0.01	0.88 \pm 0.01	0.88 \pm 0.02	0.86 \pm 0.01
10 $\mu\text{g/L}$	10.03 \pm 0.02	9.30 \pm 0.02	9.29 \pm 0.01	9.28 \pm 0.01	9.26 \pm 0.02	9.21 \pm 0.02
20 $\mu\text{g/L}$	20.04 \pm 0.05	19.01 \pm 0.04	18.98 \pm 0.03	18.85 \pm 0.03	18.80 \pm 0.04	18.73 \pm 0.03
30 $\mu\text{g/L}$	30.03 \pm 0.05	28.53 \pm 0.04	28.30 \pm 0.03	28.19 \pm 0.03	27.96 \pm 0.04	27.94 \pm 0.03
40 $\mu\text{g/L}$	40.05 \pm 0.05	38.25 \pm 0.05	38.04 \pm 0.04	37.93 \pm 0.04	37.40 \pm 0.03	37.08 \pm 0.03
50 $\mu\text{g/L}$	50.01 \pm 0.06	49.51 \pm 0.04	49.04 \pm 0.04	48.78 \pm 0.03	48.46 \pm 0.03	48.02 \pm 0.05
75 $\mu\text{g/L}$	75.02 \pm 0.03	74.18 \pm 0.05	73.75 \pm 0.03	73.44 \pm 0.03	72.84 \pm 0.03	72.39 \pm 0.04
100 $\mu\text{g/L}$	100.04 \pm 0.09	98.73 \pm 0.10	98.20 \pm 0.08	98.03 \pm 0.08	97.93 \pm 0.08	97.90 \pm 0.09

Values represent mean \pm standard deviation of each concentration. LoQ: limit of quantification (500 ng/L).

with these findings, Anedda et al. (2008) indicated that MET increased the levels of ROS and lowers the aconitase activity in 3T3-L1 cells. Similarly, Queiroz et al. (2014) demonstrated that MET induced cell cycle arrest and increased cell apoptosis in MCF-7 cells treated with 10 mM of this drug. Moreover, they explained these responses were mediated by oxidative stress, and a treatment with SOD and CAT improved cell viability. Finally, in a more recent study, Lee et al. (2019) evaluated the MET aquatic toxicity under a multi-generational exposure regimen, and found that this drug increased the ROS content and decreased the GSH activity in F0 fish. Furthermore, CAT activity was also significantly increased under MET treatment, suggesting that

environmentally relevant concentrations of this pollutant may cause oxidative stress in *Oryzias latipes*.

Mitochondria are an important source of ROS and as we aforementioned, these are involved in several cell signaling pathways. Nonetheless, ROS may also produce to oxidative damage in the proteins, membrane and DNA of mitochondria, affecting the mitochondrial capacity to synthesize ATP and to carry out their metabolic functions (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006). This is noteworthy, as mitochondrial DNA (mtDNA) alterations may disturb respiratory chain elements or ribosomal and transfer RNAs, causing several diseases (Tuppen et al., 2010). Additionally, the accumulation of dysfunctional mitochondria may increase the undesirable effects of electron-transport chain (ETC) complex I inhibitors on cell survival (Espada et al., 2020).

One of the metformin's primary functions is the inhibition of complex I of the mitochondrial ETC, leading to different changes in the mitochondrial membrane and ATP production (Andrzejewski et al., 2014; Cameron et al., 2018). These changes may result in an increased production of ROS, affecting the mitochondrial integrity, and triggering the activation of the cell's apoptotic machinery. Therefore, the body abnormalities and the accelerate hatching process found in this study may be a consequence of the inhibition of complex I of the mitochondrial ETC. In agreement with our results, a recent study investigated the toxic effects that mitochondrial inhibitors drugs induced in zebrafish embryos. In their results pointed out that different concentrations (0.3 nM–10 mM) of complex I and II inhibitors induced several malformations in embryos of this fish. These malformations included edema, eye, head and skeletal defects, hypopigmentation, gastrula arrest, yolk sac necrosis and bleeding (Pinho et al., 2013).

There are two mechanisms by which mitochondria increase the production of superoxide. In the first one, the NADH pool is reduced, for example by alterations in the respiratory chain, low ATP demand and loss of cytochrome *c* through the apoptosis. This leads to the formation of superoxide, at the flavin mononucleotide (FMN), in a rate that is established by the amount of FMN reduced (Kushnareva et al., 2002; Liu et al., 2002; Kussmaul and Hirst, 2006). In the second one, there is no ATP production and there is a high protonmotive force and a reduced coenzyme Q (CoQ) which leads to a reverse electron transport through complex I, producing large amount of superoxide (St-Pierre et al., 2002; Liu et al., 2002). Until now, it is believed that the inhibition of mitochondrial complex I by MET may disrupt the electron flow, and cause the superoxide generation by an FMN reduction (Lee et al., 2019). Nonetheless, more studies are needed to better understand the mechanism by which this drug increases the production of superoxide in the mitochondria.

At low concentrations (1 µg/L–75 µg/L), MET increased the mortality, malformations severity, hatching rate, and oxidative stress biomarkers in a concentration dependent manner. Nonetheless, at a concentration of 100 µg/L, all the endpoints evaluated in this work were significantly declined with regard the other treatment groups. Interestingly, this is not the first study that found these variations at higher concentrations of this drug. Jacob et al. (2018) for instance, demonstrated that the quantity of hepatic glycogen was increased in brown trout embryos exposed to MET. Nonetheless, this increase was specifically higher in fish exposed to the lowest MET dose. Meanwhile, at higher doses, the glycogen content in the liver showed a high inconsistency. Similarly, Flores et al. (2020) pointed out that at the highest concentration of MET, 100% of the embryos showed an anticipated hatching. However, at the same concentration, MET conceived a 0% of teratogenicity. Therefore, we suggest MET could experience a biphasic dose-response. Hormesis is a dose-response phenomenon, characterized by a low dose response that is opposite in effect to that seen at high doses (Ray et al., 2014). Furthermore, this is highly generalizable, being independent of biological model, endpoint measured, chemical class, and interindividual variability (Calabrese and Mattson, 2017).

5. Conclusion

Embryos exposed to environmentally relevant concentrations of MET showed an anticipated hatching process, making them more vulnerable to other stressors present in the environment. MET also induced several morphological alterations on the embryos, affecting their integrity and consequently leading to their death. Among the main malformations induced by MET, it is included malformation of tail, scoliosis, pericardial edema, craniofacial malformation and yolk deformation. Since oxidative damage biomarkers (LPX, HPx, POx) increased in the embryos exposed to MET, we suggest that the embryotoxic effects of this drug may be induced through an oxidative stress mechanism. To the date is believed that this oxidative stress response is closely related to the metformin capacity of inhibit the mitochondrial complex I. Nonetheless, more studies are needed to fully comprehend the mechanism by which MET may induce oxidative stress on fish. A significant decline in the mortality, malformations severity, hatching rate, and oxidative damage was found at the highest concentration used in this study. Variability in the concentration-effect relation in MET is also indicated in other studies, and this might be awarded to the hormesis phenomena that are common in environmental toxicology. However, mechanistic explanations for this phenomenon are still lacking, and need to be further analyzed to better understand the environmental impact of this drug.

Author statement

Gustavo Axel Elizalde-Velázquez performed all the exposure experiments, Leobardo Manuel Gómez-Oliván was involved in the conception, Sandra García-Medina conducted statistical analyses, Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Gustavo Axel Elizalde-Velázquez, Sandra García-Medina and Hariz Islas Flores were involved in the interpretation of the data and the writing of the manuscript with input from María Dolores Hernández-Navarro and Marcela Galar-Martínez.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

This study was made possible by financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Project 300727).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131213>.

References

- Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C., 2006. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (12), 639–645.
- Andrzejewski, S., Gravel, S.P., Pollak, M., St-Pierre, J., 2014. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Canc. Metabol.* 2 (1), 1–14.
- Aneida, A., Rial, E., González-Barroso, M.M., 2008. Metformin induces oxidative stress in white adipocytes and raises uncoupling protein 2 levels. *J. Endocrinol.* 199 (1), 33–40.
- Bahrambeigi, S., Shafiei-Irannejad, V., 2020. Immune-mediated anti-tumor effects of metformin; targeting metabolic reprogramming of T cells as a new possible mechanism for anti-cancer effects of metformin. *Biochem. Pharmacol.* 174, 113787.
- 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 (1), 248–254.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.
- Calabrese, E.J., Mattson, M.P., 2017. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ Aging Mech. Dis.* 3 (1), 1–8.

- Cameron, A.R., Logie, L., Patel, K., Erhardt, S., Bacon, S., Middleton, P., et al., 2018. Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox Biol.* 14, 187–197.
- Crago, J., Bui, C., Grewal, S., Schlenk, D., 2016. Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 232, 185–190.
- De la Paz, J.F., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M.S., Allende, M.L., 2017. Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (4), 710.
- Elizalde-Velázquez, G.A., Gómez-Oliván, L.M., 2020. Occurrence, toxic effects and removal of metformin in the aquatic environments in the world: recent trends and perspectives. *Sci. Total Environ.* 702, 134924.
- Elliott, S.M., Brigham, M.E., Lee, K.E., Banda, J.A., Choy, S.J., Gefell, D.J., et al., 2017. Contaminants of emerging concern in tributaries to the Laurentian Great Lakes: I. Patterns of occurrence. *PLoS One* 12 (9), e0182868.
- Espada, L., Dakhovnik, A., Chaudhari, P., Martirosyan, A., Miek, L., Poliezhaeva, T., et al., 2020. Loss of metabolic plasticity underlies metformin toxicity in aged *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Metab.* 2 (11), 1316–1331.
- Flores, E.L., Lapuz, B.L., Navarrete, I., Hallare, A., 2020. Comparative toxicological analysis of metformin (Biguanide) and glibenclamide (Sulfonylureas), using zebrafish embryotoxicity test (ZFET). *Philipp. J. Health Res. Dev.* 24 (1), 52–63.
- Furutan-Seiki, M., Wittbrodt, J., 2004. Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech. Dev.* 121 (7–8), 629–637.
- Guan, Y., Wang, D., Bu, H., Zhao, T., Wang, H., 2020. The effect of metformin on polycystic ovary syndrome in overweight women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int. J. Endocrinol.* 2020.
- Gunzler, W., Flohe-Clairborne, A., 1985. Glutathione peroxidase. In: Green-Wald, R.A. (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 285–290.
- Jacob, S., Dötsch, A., Knoll, S., Köhler, H.R., Rogall, E., Stoll, D., et al., 2018. Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)? *Environ. Sci. Eur.* 30 (1), 1–16.
- Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., Andreyev, A., 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem. J.* 368 (2), 545–553.
- Kussmaul, L., Hirst, J., 2006. The mechanism of superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 103 (20), 7607–7612.
- Lee, S.Y., 2017. Assessment of Aquatic Toxicity and Endocrine Disruption Potential of Metformin, an Anti-diabetic Drug. Department of Environmental Health Sciences.
- Lee, J.W., Shin, Y.J., Kim, H., Kim, H., Kim, J., Min, S.A., Park, K., 2019. Metformin-induced endocrine disruption and oxidative stress of *Oryzias latipes* on two-generational condition. *J. Hazard Mater.* 367, 171–181.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346–357.
- Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D., 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 80 (5), 780–787.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Monshi, M., 2017. Endocrine-Disrupting Properties of Pharmaceuticals and Personal Care Products (Pcpcs): an Evaluation Using Aquatic Model Organisms. Wayne State University Theses, p. 578.
- Niemuth, N.J., Jordan, R., Crago, J., Blanksma, C., Johnson, R., Klaper, R.D., 2015. Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (2), 291–296.
- Niemuth, N.J., Klaper, R.D., 2015. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* 135, 38–45.
- Niemuth, N.J., Klaper, R.D., 2018. Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. *Aquat. Toxicol.* 195, 33–40.
- Nogueira, A.F., Pinto, G., Correia, B., Nunes, B., 2019. Embryonic development, locomotor behavior, biochemical, and epigenetic effects of the pharmaceutical drugs paracetamol and ciprofloxacin in larvae and embryos of *Danio rerio* when exposed to environmental realistic levels of both drugs. *Environ. Toxicol.* 34 (11), 1177–1190.
- Parrott, J.L., Restivo, V.E., Kidd, K.A., Zhu, J., Shires, K., Clarence, S., et al., 2021. Chronic embryo-larval exposure of fathead minnows to the pharmaceutical drug metformin: survival, growth, and microbiome responses. *Environ. Toxicol. Chem.*
- Pašková, V., Hilscherová, K., Bláha, L., 2011. Teratogenicity and embryotoxicity in aquatic organisms after pesticide exposure and the role of oxidative stress. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 211, 25–61.
- Pinho, B.R., Santos, M.M., Fonseca-Silva, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Oliveira, J.M., 2013. How mitochondrial dysfunction affects zebrafish development and cardiovascular function: an in vivo model for testing mitochondria-targeted drugs. *Br. J. Pharmacol.* 169 (5), 1072–1090.
- Posselt, M., Jaeger, A., Schaper, J.L., Radke, M., Benskin, J.P., 2018. Determination of polar organic micropollutants in surface and pore water by high-resolution sampling-direct injection-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Process. Impact.* 20 (12), 1716–1727.
- Queiroz, E.A., Puukila, S., Eichler, R., Sampaio, S.C., Forsyth, H.L., Lees, S.J., Klapner, N., 2014. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 9 (5), e98207.
- Ray, S.D., Farris, F.F., Hartmann, A.C., 2014. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, pp. 944–948.
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Carpo, J.D., Freeman, B.A., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266, 22028–22034.
- Rowan, J.A., Hague, W.M., Gao, W., Battin, M.R., Moore, M.P., 2008. Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *N. Engl. J. Med.* 358 (19), 2003–2015.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J., 2013. A novel “integrated biomarker response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2721–2725.
- August) Siripattanaphol, K., Rungruang, T., Plakomkul, V., Viravud, Y., Roongruangchai, J., 2020. Teratogenic effects of metformin hydrochloride. No. 2563. In: *Rangsit Graduate Research Conference: RGRS*, vol. 15, pp. 2706–2712.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277 (47), 44784–44790.
- Tuppen, H.A., Blakely, E.L., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., 2010. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1797 (2), 113–128.
- Ussery, E., Bridges, K.N., Pandelides, Z., Kirkwood, A.E., Bonetta, D., Venables, B.J., et al., 2018. Effects of environmentally relevant metformin exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 205, 58–65.
- Varga, Z.M., 2011. Aquaculture and husbandry at the zebrafish international resource center. *Methods Cell Biol.* 104, 453–478.
- Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H., 2011. Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281, 25–36.
- Westerfield, M., 2007. *The Zebrafish Book: a Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, fifth ed. University of Oregon press.
- Yao, B., Yan, S., Lian, L., Yang, X., Wan, C., Dong, H., Song, W., 2018. Occurrence and indicators of pharmaceuticals in Chinese streams: a nationwide study. *Environ. Pollut.* 236, 889–898.
- Zaidi, S., Gandhi, J., Joshi, G., Smith, N.L., Khan, S.A., 2019. The anticancer potential of metformin on prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 22 (3), 351–361.

3. Carta de envío del artículo experimental de guanylurea

Cover letter

Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Química



May 18, 2021

Damià Barceló, Jay Gan, Philip Hopke PhD
Co-Editors-in-Chief
Science of the Total Environment

Dear colleagues:

Enclosed please find the manuscript with title **“Guanylurea alters the embryogenesis of zebrafish via inducing an oxidative stress response”** to be considered for publication in *Science of the Total Environment*. All of the authors have read and approved the revised manuscript.

This paper shows how guanylurea (main metabolite of metformin) in environmentally relevant concentrations is capable of generating oxidative stress in embryos of a model widely used in ecotoxicology, such as *Danio rerio*. It is also shown that this compound is capable of generating alterations to embryonic development and teratogenic effects, demonstrating that both guanylurea can be dangerous for hydrobionts in water bodies.

Thanking you in advance for your attention, I remain,

Sincerely yours,

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