



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“TOXICIDAD INDUCIDA POR PARACETAMOL,  
CIPROFLOXACINO Y LA MEZCLA DE AMBOS  
EN EL BIOINDICADOR *Danio rerio*”**

T E S I S

Que para obtener el grado de Doctor en:

**“CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS”**

P R E S E N T A:

MCS. Jonathan Ricardo Rosas Ramírez

COMITÉ DE TUTORES:

Dra. Hariz Islas Flores

Dr. Leobardo Gómez Oliván

Dr. Demetrio Raldúa Pérez



Toluca, Estado de México, Año 2021



**Dedicado a mi madre y a mi hermano,  
por confiar y creer siempre en mi.**

*“Me parece haber sido sólo un niño jugando en la orilla del mar, divirtiéndose y buscando una roca más lisa o una concha más bonita de lo normal, mientras el gran océano de la verdad yacía ante mis ojos con todo por descubrir”*

*Isaac Newton*



## ÍNDICE

1.	RESUMEN .....	8
2.	ABSTRACT .....	9
3.	INTRODUCCIÓN .....	10
4.	MARCO CONCEPTUAL.....	14
4.1.	El agua, recurso vital y su contaminación .....	14
4.2.	Contaminantes emergentes.....	15
4.2.1.	Productos farmacéuticos .....	15
4.2.1.1.	Analgésicos/antiinflamatorios .....	17
4.2.1.2.	Antibióticos .....	18
4.2.2.	Efectos de los fármacos sobre especies acuáticas.....	19
4.3.	Bioindicador <i>Danio rerio</i> .....	21
4.4.	Etapas embrionarias de <i>Dani rerio</i> .....	23
4.5.	Mantenimiento en el laboratorio .....	25
5.	JUSTIFICACIÓN .....	26
6.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	27
7.	HIPÓTESIS.....	27
8.	OBJETIVO GENERAL.....	27
8.1.	Objetivos específicos.....	27
9.	METODOLOGÍA .....	28
9.1.	Reactivos .....	28



9.2.	Aclimatación y mantenimiento de los peces reproductores .....	28
9.3.	Producción de huevos .....	29
9.4.	Prueba de embrioletalidad .....	30
9.5.	Evaluación de la puntuación de la morfología y las alteraciones del desarrollo embrionario .....	31
9.6.	Evaluación de estrés oxidativo en embriones de pez cebra .....	32
9.7.	Índice integrado de respuesta a los biomarcadores (IBR).....	33
9.8.	Criterios de trazabilidad y validez de las pruebas.....	34
9.9.	Aprobación ética .....	34
9.10.	Análisis de datos .....	34
10.	RESULTADOS .....	36
10.1.	Pueba de embrioletalidad .....	36
10.2.	Alteraciones en el desarrollo de embriones de <i>D. rerio</i> por PCM, CPX y su mezcla binaria.....	39
10.3.	Puntuación del desarrollo embrionario a diferentes tiempos y concentraciones de PCM, CPX y sus mezclas binarias .....	41
10.4.	Efectos teratogénicos inducidos por PCM, CPX y sus mezclas binarias.....	43
10.5.	Biomarcadores de oxidación celular.....	46
10.6.	Biomarcadores de defensa antioxidante .....	50
10.7.	Índice de respuesta integral a los biomarcadores (IBRv2).....	54
11.	DISCUSIÓN .....	57



12.	CONCLUSIONES .....	66
13.	PERSPECTIVAS .....	66
14.	REFERENCIAS .....	68
15.	ANEXOS .....	84
15.1.	Estancia internacional en el Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA), Barcelona, España, donde se produjeron dos artículos de colaboración: .....	85
15.1.1.	Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety .....	85
15.1.2.	Androgenic activation, impairment of the monoaminergic system and altered behavior in zebrafish larvae exposed to environmental concentrations of fenitrothion.....	86
15.2.	Artículo producto de esta investigación: .....	87



## Índice de tablas y figuras

	Página
<b>Tabla 1</b> Ocurrencia de Paracetamol (PCM) y Ciprofloxacino (CPX) en el mundo.	13
<b>Tabla 2</b> Tasas de mortalidad y malformaciones por concentraciones ambientalmente relevantes de PCM, CPX y sus mezclas binarias en embriones de <i>Danio rerio</i> .	36
<b>Figura 1</b> Diferencias morfológicas entre <i>Danio rerio</i> adultos.	22
<b>Figura 2</b> Ciclo de vida de <i>Danio rerio</i> .	24
<b>Figura 3</b> Similitudes entre órganos del pez cebra y el humano.	25
<b>Figura 4</b> Efectos sobre la supervivencia y las malformaciones de embriones de <i>D. rerio</i>	38
<b>Figura 5</b> Principales malformaciones inducidas por PCM, CPX y Mezclas binarias en embriones de <i>D. rerio</i>	40
<b>Figura 6</b> Curvas de concentración-efecto de PCM, CPX y sus mezclas binarias en embriones de <i>D. rerio</i> .	42
<b>Figura 7</b> Principales malformaciones y malformaciones por concentración crítica de PCM, CPX y Mezclas binaris en embriones de <i>D. rerio</i> .	43
<b>Figura 8</b> Marcadores de oxidación celular; Peroxidación lipídica (LPX), Contenido de proteínas carboniladas (PCC) y Contenido de hidroperóxidos en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a PCM, CPX y sus mezclas binarias a las 72 y 96 hpf.	48
<b>Figura 9</b> Marcadores de defenza antioxidante; Actividad de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a PCM, CPX y sus mezclas binarias a las 72 y 96 hpf.	52
<b>Figura 10</b> Índice de Respuesta Integral de Biomarcadores (IBRv2) de estrés oxidativo para cada concentración de PCM, CPX y Mezclas binarias de PCM-CPX a las 72 y 96 hpf.	55



## Abreviaturas e iniciales

AINE's	Antiinflamatorios no esteroideos
SNC	Sistema nervioso central
PTAR	Plantas de tratamieto de aguas residuales
PCM	Paracetamol
CPX	Ciprofloxacino
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona-imina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
LPX	Peroxidación lipídica
HPX	Contenido de hidroperóxidos
PCC	Contenido de proteínas carboniladas
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
GPX	Glutación peroxidasa
RL	Radicales libres
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
CL <sub>50</sub>	Concentración letal 50
IT	índice teratogénico



## 1. RESUMEN

Aunque los efectos tóxicos del paracetamol (PCM) y ciprofloxacino (CPX) han sido estudiados muy ampliamente en las últimas décadas, el impacto que la mezcla PCM-CPX puede inducir en los organismos acuáticos es poco estudiada. El objetivo de este trabajo fue investigar los efectos teratogénicos y estrés oxidativo que los fármacos PCM, CPX y su mezcla inducen en embriones de *Danio rerio*. Además se investigó si la mezcla PCM-CPX induce efectos más severos en los embriones que los fármacos individuales. Para ello, los embriones de pez cebra (4 hpf) fueron expuestos a concentraciones ambientalemnte relevantes de PCM, CPX y su mezcla hasta las 96 hpf. Y a las 72 y 96 hpf, también se evaluaron los biomarcadores de estrés oxidativo (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, peroxidación lipídica, contenido de hidroperóxidos y carbonilos) en los embriones. Los resultados demostraron que el PCM, CPX y su mezcla redujeron la tasa de supervivencia de los embriones hasta en un 75%. Además, ambos fármacos indujeron alteraciones morfológicas en los embriones provocando su muerte. Las malformaciones más observadas fueron: escoliosis, malformaciones craneofaciales, hipopigmentación, retraso en el crecimiento, edema pericárdico. En cuanto al estrés oxidativo, el análisis de respuesta integrada de biomarcadores (IBR) demostró que el PCM, CPX y su mezcla inducen daños oxidativos en los embriones. En conclusión, PCM, CPX y su mezcla pueden alterar el desarrollo embrionario del pez mediante una respuesta de estrés oxidativo.



## 2. ABSTRACT

Even though the toxic effects of paracetamol (PCM) and ciprofloxacin (CPX) have been deeply studied in the last decades, the impact of the PCM-CPX mixture may induce in aquatic organisms is poorly known. Thus, the objective of this work was to investigate the teratogenic effects and oxidative stress that PCM, CPX, and their mixture induce in *Danio rerio* embryos. Moreover, we aimed to determine whether the PCM-CPX mixture induces more severe effects on the embryos than the individual drugs. For this purpose, zebrafish embryos (4 hpf) were exposed to environmentally relevant concentrations of PCM, CPX, and their mixture until 96 hpf. In addition, at 72 hpf and 96 hpf, we also evaluated the oxidative stress biomarkers (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, lipid peroxidation, and hydroperoxides and carbonyl content) in the embryos. Our results demonstrated that PCM, CPX, and their mixture reduced the survival rate of embryos by up to 75%. In addition, both drugs, induced morphological alterations in the embryos, causing their death. The most observed malformations were: scoliosis, craniofacial malformations, hypopigmentation, growth retardation, pericardial edema. Concerning oxidative stress, our integrated biomarkers response (IBR) analysis demonstrated that PCM, CPX, and their mixture induce oxidative damage on the embryos. In conclusion, PCM, CPX, and their mixture can alter zebrafish embryonic development via an oxidative stress response.



### 3. INTRODUCCIÓN

El consumo de analgésicos y antipiréticos, así como de antiinflamatorios no esteroideos (AINE), va en aumento debido a que se adquieren libremente, es decir, no requieren receta médica para su venta. Entre ellos, el AINE más conocido y consumido mundialmente es el paracetamol (PCM). Este fármaco es el más utilizado para dolor intenso y astrosis, para las úlceras gástricas y duodenales, gastritis y hernia de hiato, como tratamiento alternativo en caso de alergia a los salicilatos y en pacientes con hemofilia o que reciben anticoagulantes (Lau et al., 2016). Según el informe de ventas de mercado global de paracetamol para el año 2018, mundialmente se obtuvieron ganancias de 740 millones de dólares estadounidenses. Y se prevé que para el año 2023 sus ventas aumenten a 780 millones de dólares.

Como consecuencia de su elevado uso y de su degradación parcial (14-75%), cada día se vierten enormes cantidades de PCM en el medio acuático (Gutiérrez-Noya et al., 2021). Estudios recientes han reportado la ocurrencia de esta droga en cuerpos de agua en todo el mundo. La **Tabla 1** muestra la ocurrencia mundial de PCM en ambientes acuáticos. En esta tabla se puede observar la mayor concentración de PCM encontrada en el efluente de la planta de tratamiento de aguas (PTAR) y en las aguas superficiales de  $3,000 \mu\text{gL}^{-1}$  y  $30.4 \mu\text{gL}^{-1}$ , respectivamente.

El paracetamol es biotransformado por el citocromo P450 (CYP450) en el hígado a través de las subfamilias CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A4, lo que provoca la formación de un metabolito muy inestable con gran afinidad por los grupos tiol N-acetil-p-benzoquinona-imina y puede causar modificaciones estructurales en las proteínas celulares y, por lo tanto, daños en el



ácido desoxirribonucleico (ADN), el ácido ribonucleico (ARN), así como estrés oxidativo (Moriarty & Carroll, 2016; Xu et al., 2008). Choi et al., (2018) mostraron que el PCM (10 y 30  $\mu\text{gL}^{-1}$ ) indujo daños histológicos en las branquias, daños estructurales en el riñón y disminución de los niveles de glucógeno en el hígado de *Oncorhynchus mykiss*, después de 4 semanas de exposición. Además, Liu et al., (2019) demostraron que el PCM alteraba la expresión de Nrf1, un factor de transcripción relacionado con el sistema antioxidante, en *Daphnia magna*. Del mismo modo, Gutiérrez-Noya et al., (2021) señalaron que el estrés oxidativo inducido por el PCM producía teratogénesis en embriones de *Cyprinus carpio*. Así, los efectos adversos inducidos por el PCM están estrechamente relacionados con el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante su proceso de biotransformación.

Los antibióticos son también un grupo importante de medicamentos cuyo consumo mundial ha ido en aumento (González Peña et al., 2021). A este grupo pertenecen las fluoroquinolonas, utilizadas en la medicina humana y veterinaria para el tratamiento de múltiples infecciones bacterianas (Ávila et al., 2019). Ciprofloxacino (CPX) es una fluoroquinolona de amplio espectro utilizada habitualmente para el tratamiento de enfermedades como la faringitis, la sinusitis y los dolores de oído, así como de enfermedades de las vías respiratorias como la neumonía y la bronquitis (Yi et al., 2017).

Debido al abuso en su consumo y a su escasa biodegradabilidad, el CPX se ha detectado cada vez más en aguas residuales (Li et al., 2019). Las tres principales fuentes de entrada de CPX en aguas residuales son la industria, los hospitales y los hogares. En la **Tabla 1** se muestra la



ocurrencia de CPX en diferentes entornos acuáticos alrededor del mundo. Hasta ahora, las concentraciones más altas de este fármaco encontradas en efluentes plantas de tratamiento de aguas (WWTP), efluentes hospitalarios y aguas superficiales fueron de  $341 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $38.6 \mu\text{gL}^{-1}$  y  $5\,528 \mu\text{gL}^{-1}$ , respectivamente.

Al igual que el PCM, también se ha demostrado que el CPX puede generar estrés oxidativo y muerte celular al estimular la producción de ROS, afectando a los lípidos, el ADN y otros componentes celulares (Becerra & Albesa, 2002). Zivna et al., (2016) por ejemplo, informaron que la exposición de embriones de *C. carpio* a CPX ( $1\,000 \mu\text{gL}^{-1}$  y  $3\,000 \mu\text{gL}^{-1}$ ) provocó la muerte del 32% de los embriones. Además, Gomes et al., (2017) informaron que el CPX indujo estrés oxidativo en *Lemna minor* al perjudicar el flujo normal de electrones en la cadena respiratoria de transporte de electrones.

Dado que el mecanismo de toxicidad de ambos fármacos es el estrés oxidativo, y este último se ha asociado a efectos teratogénicos en varias especies acuáticas. El propósito de este estudio fue evaluar los efectos teratogénicos y el estrés oxidativo que tienen el PCM, el CPX y su mezcla en embriones de *Danio rerio*. Además, también llevamos a cabo un análisis integrado de biomarcadores (IBR) para comprender mejor la influencia que tienen los biomarcadores de estrés oxidativo (peroxidación lipídica (LPX), contenido de hidroperóxidos (HPX), contenido de proteínas carboniladas (PCC), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX)) en los embriones de este pez.



**Tabla 1.** Ocurrencia de paracetamol y ciprofloxacino en el mundo

<b>País</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Matríz</b>	
<b>Paracetamol</b>			
Brasil	30.4	Agua superficial	Campanha et al., 2015
Canadá	57.5	Efluente (PTAR)	Ba et al., 2014
Canadá	90.2	Efluente (PTAR)	Ba et al., 2014
China	150	Efluente (PTAR)	Wu et al., 2012
Colombia	39.25	Efluente (PTAR)	Botero-Coy et al., 2018
Costa Rica	13.21	Agua superficial	Spongberg et al., 2011
EE. UU.	1,000	Efluente (PTAR)	Wilcox et al., 2014
Italia	246	Efluente (PTAR)	Verlicchi et al., 2012
Japón	1.7	Efluente (PTAR)	Okuda et al., 2008
México	3,000	Efluente (PTAR)	SanJuan-Reyes et al., 2015
España	246	Efluente (PTAR)	Gomez et al., 2012
UK	211.3	Efluente (PTAR)	Kasprzyk-Hordem et al., 2009
<b>Ciprofloxacino</b>			
Argentina	7.7	Agua superficial	Teglia et al., 2019
China	5.9	Agua superficial	Wei et al., 2012
EE.UU.	1.3	Efluente (PTAR)	He et al., 2015
India	5,528	Agua superficial	Gothwal et al., 2015
Pakistán	341	Efluente (PTAR)	Riaz et al., 2017
Portugal	38.6	Efluente hospitalario	Santos et al., 2013
Korea del sur	8.7	Efluente (PTAR)	Sim et al., 2011
Vietnam	0.25	Agua superficial	Andrieu et al., 2015



## **4. MARCO CONCEPTUAL**

### **4.1. El agua, recurso vital y su contaminación**

El agua es el recurso vital más importante del mundo ya que es indispensable para la supervivencia de todos los organismos. La superficie terrestre está cubierta por agua salada en un 98%, el 2% restante es agua dulce, el 1.6% se encuentra capturada en los glaciares y sólo el 0.036% se encuentra disponible en ríos y lagos para su uso (Khatun, 2017). De acuerdo con *HydroSHEDS*, en el mundo existen un total del 8.5 millones de tramos fluviales individuales que representan 35.9 millones de Km de ríos en todo el mundo. Y alrededor de 1.4 millones de lagos con una superficie promedio de 10 Ha.

El término “contaminación” se refiere a la introducción de una cantidad excesiva de una sustancia en el medio ambiente; recursos hídricos, aire o tierra (Terera & Ngirande, 2010), o de varias sustancias que puedan modificar las cualidades naturales a tal grado que no pueda ser utilizada para un propósito específico, provocando así daños a la salud (Kais et al., 2013).

La contaminación acuática puede ser generada por prácticas agrícolas, descargas domésticas, municipales, hospitalarias y descargas industriales. Estas actividades generan residuos que son incorporados de manera constante a diferentes ambientes acuáticos en donde se dispersan, concentran o persisten por largo tiempo afectando a la flora, fauna y salud humana (Goel, 2006).



## **4.2. Contaminantes emergentes**

El término “contaminantes emergentes” se refiere a compuestos que están presentes en el medio ambiente y que tienen la capacidad de ocasionar un impacto ecológico (Barceló & López, 2008; Calvo-Flores et al., 2017). Son compuestos de los que se tiene poco conocimiento y en muchas ocasiones se desconocen las consecuencias ambientales que pudieran ocasionar, razón por la cual no existe una regulación estricta, no están sometidos a un monitoreo rutinario o de control de emisiones y por lo tanto los métodos para su análisis es limitada (Paches, 2020). Generalmente son detectados en ambientes acuáticos en concentraciones que van desde  $\text{ngL}^{-1}$  a  $\mu\text{L}^{-1}$  (Dulio et al., 2018; Barceló & López, 2008).

Los contaminantes emergentes incluyen muchos compuestos de diferente naturaleza: productos químicos, productos de cuidado personal, agentes tensoactivos, plastificantes, aditivos industriales, productos farmacéuticos y compuestos nuevos, y la mayoría de ellos presentan la característica de ser depositados constantemente en el ambiente (Janet Gil et al., 2012). En la mayoría de los casos, las plantas de tratamiento de aguas residuales no cuentan con el diseño para eliminar totalmente estos contaminantes, lo que implica que sean vertidos a cuerpos de agua de manera directa (Murray et al., 2010).

### **4.2.1. Productos farmacéuticos**

Actualmente los productos farmacéuticos son considerados contaminantes emergentes por presentarse en mayor concentración que otros compuestos en los ambientes acuáticos. Y considerando que los productos farmacéuticos son ampliamente consumidos a nivel mundial,



es muy probable que sean localizados en medios acuáticos, motivo por el cual son de especial interés. La llegada de los productos farmacéuticos puede ocurrir por diferentes factores como excreciones humanas, mala disposición doméstica, el uso agrícola, acuícola, los desechos industriales y las descargas de plantas de tratamiento de agua (Watkinson et al., 2009). Además los productos farmacéuticos cuentan con propiedades fisicoquímicas que les permiten ser transportados a ambientes acuáticos directamente o en subproductos de la biotransformación. Además, por sus propiedades fisicoquímicas pueden ser altamente riesgosos para los organismos acuáticos, ya que están diseñados para ejercer acciones biológicas específicas. Por ejemplo, aproximadamente el 30% de ellos son lipofílicos y no logran disolverse en agua. De esta manera pueden atravesar las membranas celulares y actuar dentro de ellas. Esto quiere decir que una vez en los cuerpos de agua, los fármacos pueden formar parte de la cadena alimenticia. Además, como parte de su metabolismo se pueden generar biomoléculas o subproductos que pueden tener mecanismos de acción diferentes a los establecidos y así ejercer un efecto negativo tanto en animales como en humanos.

Entre los productos farmacéuticos más consumidos a nivel mundial se encuentran los analgésicos/antiinflamatorios y los antibióticos. Estos fármacos son cada vez más utilizados por el ser humano y por la veterinaria en actividades como la ganadería, acuicultura, y la avicultura (Gómez et al., 2006).



#### 4.2.1.1. Analgésicos/antiinflamatorios

Los analgésicos son el tipo de fármacos de mayor consumo mundial y son considerados como los de mayor automedicación al no requerir receta médica para su venta. Entre los analgésicos/antiinflamatorios se encuentra al paracetamol (PCM) y se han hecho estudios que reportan su presencia en diferentes cuerpos de agua; plantas de tratamiento de aguas residuales, descargas hospitalarias, ríos y lagos (Gómez et al., 2006). Diferentes autores han reportado las concentraciones de paracetamol y sus metabolitos en aguas superficiales y en organismos acuáticos (Fito-López et al., 2018; Gómez et al., 2006b; Tejada et al., 2014).

En China, por ejemplo, han sido detectadas concentraciones máximas de PCM hasta 0.45 y 0.51  $\mu\text{gL}^{-1}$  en aguas superficiales y plantas de tratamiento de aguas residuales, respectivamente (Duan et al., 2020; Li et al., 2019b). En Chennai, India, Delhiraja & Philip (2020) se reportó la ocurrencia de 13.18  $\mu\text{gL}^{-1}$  de este fármaco en aguas municipales. En el continente americano también ha sido reportada la ocurrencia de este fármaco. Por ejemplo, en Canadá, Greenham *et al.*, (2019), reportaron la concentración de paracetamol hasta en 141.3  $\mu\text{gL}^{-1}$  en plantas de tratamiento de aguas residuales. Mientras que en Brasil, se reportó una concentración máxima de 42 y 133  $\mu\text{gL}^{-1}$  en aguas de río y agua potable respectivamente (Raymundo-Pereira et al., 2019; Veras et al., 2019). En México también ha sido reportada la ocurrencia de este fármaco, en concentraciones de 2.6  $\mu\text{gL}^{-1}$  en un efluente hospitalario (Pérez-Álvarez et al., 2018).



#### 4.2.1.2. Antibióticos

Los antibióticos también son considerados contaminantes emergentes al ser uno de los tipos de fármacos más consumidos en el mundo. El incremento en el consumo de antibióticos se basa principalmente en su efecto contra microorganismos patógenos en humanos y en animales, así como en la preservación de alimentos lo que permite descargas elevadas en cuerpos de agua. Autores han reportado la interacción de los antibióticos con mecanismos de defensa en organismos acuáticos. Entre los antibióticos con mayor reporte en cuerpos de agua se encuentran las quinolonas (Cartagena, 2011). Ciprofloxacino (CPX) es una quinolona considerada de amplio espectro. Este antibiótico también ha sido detectado en ambientes acuáticos siendo las descargas hospitalarias, descargas domésticas y agrícolas las principales fuentes de descarga de este fármaco (Cartagena, 2011; Ebert et al., 2011; Halling-Sorensen et al., 2000; Hartmann et al., 1998).

Recientes estudios han reportado la ocurrencia de CPX en ambientes acuáticos. Adachi et al., (2013) detectaron una concentración máxima de  $0.008 \mu\text{gL}^{-1}$  de CPX en aguas superficiales de Ozaka, Japón. Así mismo, en la India se reportó una concentración máxima de CPX de  $5,528 \mu\text{gL}^{-1}$  en aguas superficiales debido a descargas cercanas de plantas de tratamiento de aguas residuales (Gothwal & Shashidhar, 2017). En Brasil, Arsand et al., (2020) reportaron  $0.32 \mu\text{gL}^{-1}$  en aguas superficiales. Ciprofloxacino también ha sido detectado en otras partes del mundo como; aguas superficiales: Vietnam,  $3.03 \mu\text{gL}^{-1}$ , Sur de Antártida,  $1.86 \mu\text{gL}^{-1}$ , China,  $0.01 \text{ngL}^{-1}$ ; plantas de tratamiento: Canadá,  $2.5 \mu\text{gL}^{-1}$ , Grecia,  $0.59 \mu\text{gL}^{-1}$ , China,  $0.09 \mu\text{gL}^{-1}$ , México,  $1.86 \mu\text{gL}^{-1}$ : agua potable: China,  $0.22 \mu\text{gL}^{-1}$  (Tran et al., 2019, Hernández et



al., 2019, Hanna et al., 2018, Guerra et al., 2014, Papageorgiou et al., 2016, Hanna et al., 2018, Estrada-Arriaga et al., 2016, Hanna et al., 2018).

#### **4.2.2. Efectos de los fármacos sobre especies acuáticas**

Los efectos tóxicos de los fármacos en ambientes acuáticos pueden ser muchos, sin embargo no son comprendidos en su totalidad. Se ha demostrado que los fármacos pueden afectar al sistema inmune, generar estrés oxidativo o afectar la funcionalidad de órganos, aún cuando se encuentran en concentraciones muy bajas (Cartagena, 2011). Muchos estudios han tratado los efectos negativos que los fármacos como PCM y CPX pueden ocasionar los organismos, en especial a los organismos acuáticos como *D. rerio*. Nogueira et al., (2019) expusieron embriones de *D. rerio* a diferentes concentraciones de PCM (5-3,125  $\mu\text{gL}^{-1}$ ), indicaron que las concentraciones de 125 y 3,125  $\mu\text{gL}^{-1}$  de PCM tuvieron efectos embrietales sobre esta especie a 96 hpf. También reportaron que se presentó retraso en el desarrollo, escoliosis, desarrollo anormal de columna y falta de pigmentación. Indicaron que la falta de pigmentación se presentó principalmente a las 48, 72 y 96 hpf en la concentración de 625  $\mu\text{gL}^{-1}$  debido a que PCM podría modular la respuesta de pigmentación en las larvas expuestas. David & Pancharatna, (2009) indicaron que tras 7 días de exposición a la concentración de 100  $\mu\text{gL}^{-1}$  de PCM se ocasionó letalidad del 50% de embriones de *D. rerio*. Detectaron diferentes malformaciones como alteraciones en el tiempo de eclosión, crecimiento y morfometría de las larvas, formación de cola/aletas y falta de pigmentación tras la exposición a diferentes concentraciones de PCM (1-100  $\mu\text{gL}^{-1}$ ) por 7 días. Indicaron



que la falta de pigmentación fue una de las alteraciones que se presentó en mayor medida en la concentración de  $100 \mu\text{gL}^{-1}$  y podría deberse a una afectación en las células encargadas de la distribución de pigmento tanto en las células de retina como en los melanóforos de la cabeza y región del saco vitelino, y aunque no afectó la supervivencia dio lugar a embriones albinos por la ausencia de pigmentos a lo largo de su cuerpo. David & Pancharatna, (2009) también han reportado retraso en la eclosión por la exposición a PCM. Ellos reportaron que los embriones expuestos a las concentraciones de 1, 10, 50 y  $100 \mu\text{gL}^{-1}$  el proceso de eclosión se extendió hasta el día cinco. Xia et al., (2017) también reportaron retraso en la eclosión por AINE's como ibuprofeno, diclofenaco y PCM ( $5-500 \mu\text{gL}^{-1}$ ). Indicaron que algunos AINE's en altas concentraciones son capaces de disminuir los movimientos espontáneos en las primeras horas de desarrollo y lo relacionaron con la eclosión de los embriones al afectar la locomotividad. Zivna et al., (2016) evaluaron los efectos letales de CPX sobre embriones de *C. carpio* a las concentraciones de  $1-3000 \mu\text{gL}^{-1}$  durante 33 días. Y reportaron que las concentraciones de  $1,000$  y  $3,000 \mu\text{gL}^{-1}$  causaron muerte embrionaria del 29 y 32%, respectivamente. También se ha reportado que CPX altera las concentraciones de oxígeno en la etapa embrionaria de *D. rerio* ya que modifica las funciones respiratorias del corion acelerando o retardando el proceso de eclosión y por lo tanto los movimientos mecánicos de los embriones, y el intercambio de moléculas entre la superficie del tejido embrionario y el medio ambiente, y también se ha reportado que la ocurrencia simultánea de antibióticos como CPX con PCM podrían ocasionar un efecto toxico mayor en especies acuáticas (Korwin-Kossakowski, 2012). Actualmente no hay estudios que traten acerca de los efectos tóxicos



conjuntos de un AINE y un antibiótico sobre embriones de *D. rerio*. Sin embargo, se ha demostrado que el uso concomitante de PCM y CPX puede provocar un retraso de la acción de PCM (Issa et al., 2006, 2007).

#### **4.3. Bioindicador *Danio rerio***

El pez cebra (*Danio rerio*) es un organismo tropical de agua dulce originario del río Ganges y sus afluentes en el norte de la India. En su hábitat natural se encuentra cerca del fondo del agua para evitar ataques de depredadores (Tavares & Lopes, 2013). Actualmente se considera un modelo adecuado para investigar el desarrollo embrionario, genética, comportamiento, fisiología y nutrición. El pez cebra se clasifica como omnívoro, además ingiere gran cantidad de alimentos distintos (eurófago) como desechos de otros peces, larvas, insectos y zooplancton. Y en investigaciones en las que se ha utilizado se ha demostrado que puede ser alimentado de diferentes tipos de alimentos, niveles de alimentación y nutrición. Sin embargo, en el laboratorio de investigación el pez cebra debe recibir el tipo y nivel adecuados de nutrientes en la dieta para garantizar la obtención de resultados de investigación razonables (Gonzales & Law, 2013). El pez cebra se ha vuelto un modelo biológico muy popular en los últimos años para evaluaciones toxicológicas y biomédicas. Una de las razones importantes para su uso es por que *Danio rerio* en sus primeras etapas de crecimiento es transparente y se desarrolla fuera del útero. Este proceso de desarrollo único en su especie permite estudiar los detalles del desarrollo a partir de la fecundación, además las técnicas moleculares disponibles en la actualidad permiten que este modelo pueda ser utilizado en



casi todos los aspectos de la biología a nivel mundial. El pez cebra cuenta con muchas ventajas sobre otras especies, las características más importantes son que su genoma se encuentra totalmente secuenciado, tiene alta fecundidad, el tiempo de crecimiento a la adultez es relativamente corto (3 meses aproximadamente), el desarrollo embrionario es rápido (24 hpf) y la fertilización es externa. El embrión traslucido de esta especie permite el estudio en diferentes etapas de su desarrollo a partir de la embriogénesis. Y los embriones de esta especie forman sistemas de órganos completos como el digestivo, el corazón y el nervioso a partir de las 48 hpf. El pez cebra en su edad adulta mide 3-5 cm de largo, cuenta con rayas longitudinales y generalmente con una coloración dorada en cola y aletas, los machos y hembras adultos se diferencian a simple vista, los machos son delgados y largos, mientras que las hembras son un poco más voluminosas, tienen el vientre abultado y redondeado al cargar con los huevos y cuentan con una papila genital muy notoria (**Figura 1**).



**Figura 1.** Diferencias visuales entre pez

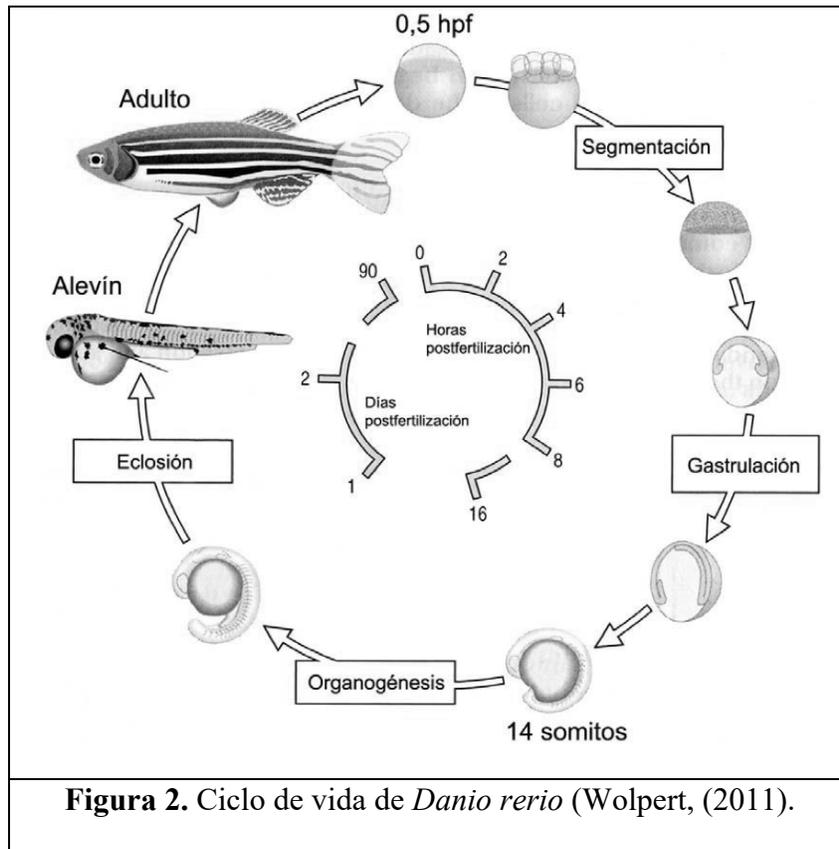
cebra a) macho y b) hembra

(Modificado de Armengol, (2018))



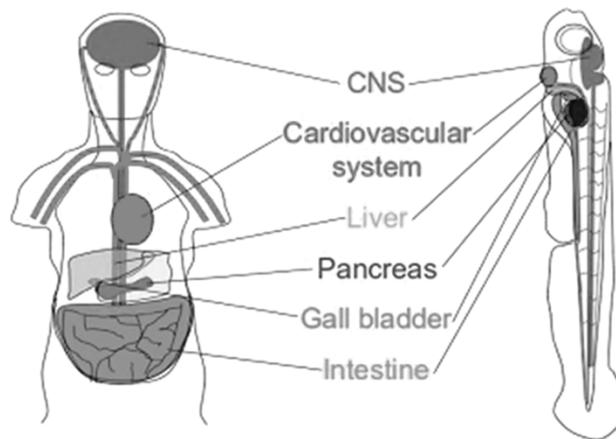
#### 4.4. Etapas embrionarias de *Dani rerio*

Las principales etapas de desarrollo embrionario de *D. rerio* son: segmentación, gastrulación, organogénesis y eclosión (**Figura 2**). El periodo de cigoto (0 – 0.15 hpf) comprende desde el momento de la fertilización hasta que ocurre la primera división celular. Posteriormente comienza la etapa de división celular (0.15 – 2.25 hpf) que comprende desde la primera división celular hasta la séptima división. En el periodo de blástula (2.25 – 5.15 hpf) continúan las divisiones celulares hasta que el cigoto toma forma esférica. En el periodo de gástrula (5.15 – 10 hpf) inician los movimientos morfogénéticos que permiten la formación de las capas germinales primarias (a partir de las cuales se forman tejidos y órganos). Posteriormente llega el periodo de segmentación (10-24 hpf) donde se empiezan a formar las somitas (precursores de músculo y esqueleto) desde el tronco hasta la cola. Y se empiezan a notar algunos órganos. En el periodo de faríngrula (24-48 hpf) se continua con el desarrollo morfológico, donde se empiezan a formar las aletas y el sistema circulatorio, aparece la sensibilidad a estímulos y se diferencian las células pigmentarias. En el periodo de eclosión (48-72 hpf) se completa la organogénesis y también se desarrolla la aleta pectoral. Y en el periodo de larva se ha completado la mayoría de la morfogénesis del pez, es apto para nadar y realizar búsqueda de alimento (Wolpert, 2011).



Esta especie acuática tiene la capacidad de reaccionar rápidamente a la presencia de contaminantes en el medio, y por este motivo ha sido considerada como un sistema biológico para la detección de contaminantes en sistemas acuáticos. Las investigaciones con esta especie se han podido llevar a cabo por que el huevo es semipermeable y muchos genes y sus funciones son muy similares a los de cuerpo humano hasta en un 85%. Existen muchos ejemplos de enfermedades humanas que se han modelado con éxito en el pez cebra como la distrofia muscular, melanoma humano, leucemia linfoblástica aguda, poliquistosis renal, nefropatía, insuficiencia renal aguda, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, infarto al miocardio, y muchas enfermedades metabólicas. Además existe una gran similitud

genómica de esta especie con los humanos, cuentan con la presencia de órganos y sistemas de órganos, así como rutas metabólicas muy similares (**Figura 3**) (Teame et al., 2019). En el año 2010 esta especie acuática fue incorporada en el listado de animales empleados en procedimientos experimentales.



**Figura 3.** Similitudes entre órganos del pez cebra y el humano

(Teame et al., 2019)

#### **4.5. Mantenimiento en el laboratorio**

Los peces se deben mantener en el laboratorio en agua con pH 8.0 aproximadamente, la temperatura del agua donde se desarrollan debe ser óptima entre los 27-29 °C de manera constante, sin fluctuaciones bruscas de temperatura. En el caso de los embriones se ha reportado que la temperatura es un parámetro importante para el desarrollo de los mismos (27 °C). Y de no controlarse se podrían generar cambios importantes en el desarrollo de los



embriones. Además se ha demostrado que la temperatura juega un papel importante en la disolución, adsorción y concentración de algunas sustancias aumentando su potencial tóxico (Tavares & Lopes, 2013).

## 5. JUSTIFICACIÓN

La ocurrencia de PCM y CPX en ambientes acuáticos en concentraciones ambientalmente relevantes se debe a su alto consumo a nivel mundial. Las descargas industriales, el uso veterinario, la mala disposición, descargas de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales e industriales forman parte de la ocurrencia de estos fármacos. En muchas ocasiones PCM y CPX llegan a ser prescritos en conjunto, por lo que desde el punto de vista ambiental su ocurrencia no se presenta en forma individual, sino que también pueden estar presentes en conjunto o en una forma distinta a la original por la biotransformación o interacción con otros compuestos. Una vez que estos compuestos pasan a ser parte del ambiente podrían causar efectos negativos como daño a órganos y tejidos, alteraciones en la reproducción y en el comportamiento, alteraciones bioquímicas, estrés oxidativo, embriotoxicidad y teratogenicidad en organismos acuáticos como *D. rerio*, el cual es un modelo acuático por excelencia para la determinación e identificación de efectos ecotoxicológicos. Debido a los reportes de ocurrencia de PCM y CPX en ambientes acuáticos es necesario llevar a cabo estudios para la determinación de los efectos negativos que estos pudieran ocasionar sobre especies acuáticas y de esta manera aportar conocimiento para el control de sus emisiones.



## 6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las concentraciones ambientalmente relevantes de PCM, CPX y su mezcla ocasionan embrioletalidad, teratogenicidad y estrés oxidativo sobre embriones de *D. rerio* a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf?

## 7. HIPÓTESIS

La exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de PCM, CPX y su mezcla inducirán efectos teratogénicos y alteraciones en el desarrollo embrionario de *Danio rerio*.

## 8. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de PCM, CPX y su mezcla sobre el bioindicador *Danio rerio*.

### 8.1. Objetivos específicos

- Evaluar los efectos en el desarrollo embrionario de *Danio rerio* por la exposición a diferentes concentraciones de PCM y CPX.
- Determinar la  $CL_{50}$  de PCM y CPX de embriones de *Danio rerio*.
- Determinar la  $CE_{50}$  de malformaciones de PCM y CPX de embriones de *Danio rerio*.
- Determinar el Índice Teratogénico ( $CL_{50}/CE_{50}$ ) de PCM y CPX de embriones de *Danio rerio*.



- Identificar y cuantificar las malformaciones en el desarrollo embrionario de *Danio rerio* tras la exposición a diferentes concentraciones de PCM y CPX y su mezcla.
- Determinar estrés oxidativo mediante diferentes biomarcadores en embriones de *Danio rerio* por la exposición a diferentes concentraciones de PCM, CPX y su mezcla.

## 9. METODOLOGÍA

### 9.1. Reactivos

Paracetamol (N-acetil-4-aminofenol, número CAS: 103-90-2), fórmula lineal  $\text{CH}_3\text{CONHC}_6\text{H}_4\text{OH}$ , pureza analítica del 99%. Ciprofloxacino (ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico, número CAS 85721-33-1), fórmula lineal  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$  y pureza analítica  $\geq 98\%$  se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Todos los reactivos mencionados en la metodología se adquirieron en la misma compañía, a menos que se haga referencia a otra empresa.

### 9.2. Aclimatación y mantenimiento de los peces reproductores

Los peces cebras utilizados en el estudio fueron de tipo salvaje ( $0.9 \pm 0.5$  g de peso y  $3.5 \pm 0.5$  cm de longitud) fueron adquiridos comercialmente (Aquanimals MX) siguiendo los requisitos solicitados en las directrices OCDE. Ningún pez presentaba signos visibles de enfermedad y estrés, ni malformaciones aparentes. Para su aclimatación los peces se mantuvieron en tanques de 120 L, a razón de un pez por cada dos litros de agua (12 horas de



luz por 12 horas de oscuridad). A lo largo del experimento el agua de cada tanque fue monitoreada y mantenida bajo las siguientes condiciones T:  $26 \pm 2$  °C, pH entre 7.2 – 7.6 y saturación de oxígeno: 85%. Además, el agua se cambió diariamente, manteniendo las características mencionadas. Los peces reproductores fueron alimentados con hojuelas comerciales (TetraMin Tropical Flakes®) [48% de proteína, 8% de grasa y 2% de fibra], dos veces al día (directriz de ensayo No. 203 para peces) y suplementados con *Artemia sp* una vez al día, 15 días antes de la producción de huevos.

### **9.3. Producción de huevos**

Los huevos de *Danio rerio* se obtuvieron por fecundación natural. Se colocaron en los tanques de cría ocho machos y cuatro hembras (con gravidez visible) de 4 – 4.5 cm de longitud. Cada tanque contenía 12 L de agua del grifo previamente aireada, clorada y reconstituida con sales comerciales Instant Ocean® a ( $9 \text{ mg L}^{-1}$ ). Además, todos los tanques contenían una trampa de cría (malla de 4x4 mm). A primera hora del día siguiente se recogieron los huevos con agua ultrapura y blanqueados según los métodos de Westerfield, 2007 y Vargas, 2011. Los ovocitos fecundados se clasificaron bajo un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 305 a 10X de aumento) según el protocolo de Kimmel et al., 1995. Se seleccionaron los ovocitos en estado de bástula media (equivalentes a 2.5 hpf) y se utilizaron para posteriores experimentos.



#### 9.4. Prueba de embrioletalidad

Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: Paracetamol; 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 y 1200  $\mu\text{gL}^{-1}$  y Ciprofloxacino: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, y 40  $\mu\text{gL}^{-1}$  teniendo en cuenta su presencia en aguas superficiales, efluentes de plantas de tratamiento de aguas y efluentes hospitalarios. Además, se probaron cuatro mezclas binarias (M):

**Mezcla 1 (M1):** correspondiente a las concentraciones más bajas de ambos fármacos (150  $\mu\text{gL}^{-1}$  de PCM y 5  $\mu\text{gL}^{-1}$  de CPX).

**Mezcla 2 (M2):** Correspondiene a la concentración efectiva de malformaciones 50 obtenida para cada fármaco de forma aislada (438.8  $\mu\text{gL}^{-1}$  de PCM y 18.2  $\mu\text{gL}^{-1}$  de CPX).

**Mezcla 3 (M3):** Correspondiente a la concentración letal de embriones 50 obtenida para cada fármaco aislado (736.9  $\mu\text{gL}^{-1}$  de PCM y 35.4  $\mu\text{gL}^{-1}$  de CPX).

**Mezcla 4 (M4):** correspondiente a las concentraciones más altas de ambos fármacos (1200  $\mu\text{gL}^{-1}$  de PCM y 40  $\mu\text{gL}^{-1}$  de CPX).

Todas las concentraciones se realizaron a partir de los estándares mencionados en la sección 4.1. Además, se prepararon a partir de la solución madre en matraces volumétricos oscuros para evitar fotodegradación.

Las pruebas de letalidad se basaron en el análisis FET (Fish Embryo Acute Toxicity). Se seleccionaron 144 huevos en la fase media de la blástula (2.5 hpf) y se distribuyeron aleatoriamente en placas de 24 pocillos (1 embrión por pocillo). Las placas se incubaron en cámaras bioclimáticas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , con ciclos de luz y oscuridad de 8:14 h. Todos los susteas eran estáticos con renovación diaria del medio. La temperatura y la humedad de la cámara



de incubación se controlaron hasta el final del ensayo. Se cuantificó el número de embriones vivos, muertos (coagulados o son latidos) y malformados a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular la CL50 y la CE50 de los embriones mediante una prueba de regresión lineal de máxima verosimilitud, y se calcularon sus respectivos intervalos de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ). Este análisis se realizó con el software US-EPA ver 1.5, según el método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). La relación  $CL_{50}/EC_{50}$  se utilizó para determinar el índice teratogénico (IT). Si el valor de IT es  $> 1$ , la sustancia debe considerarse teratogénica, pero si es  $< 1$ , la sustancia debe clasificarse como letal para el embrión Weigt et al., (2011).

#### **9.5. Evaluación de la puntuación de la morfología y las alteraciones del desarrollo embrionario**

Se utilizaron sistemas similares a los descritos en la sección 7.4. Las principales malformaciones inducidas por PCM, CPX y su mezcla se registraron basándose en la escala establecida por Kimmel et al., (1995) y Hermsen et al., (2011). Un embrión experimental es comparado con el embrión de referencia y recibe puntos para cada etapa en función de su etapa de desarrollo. Todas las desviaciones, por ejemplo, el desprendimiento incompleto de la cola, darán lugar a una menor puntuación que corresponde a un cierto grado de retraso en el desarrollo. La formación de la cola, la formación de las somitas, el desarrollo de los ojos, el movimiento del embrión, los latidos de corazón, la circulación sanguínea, la



pigmentación de la cabeza y el cuerpo, la pigmentación de la cola, la presencia de la protuberancia bucal y la eclosión fueron todos los puntos evaluados de desarrollo.

Las malformaciones y otros efectos teratogénicos se registraron por separado como presentes o ausentes. A lo largo del experimento, se evaluaron las siguientes alteraciones: retraso en el proceso de eclosión, hipopigmentación, hemorragia en la cabeza, hemorragia en la cola, hemorragia en el saco, varios; malformaciones graves, estructura de la corda modificada, malformación de la cabeza malformación del corazón, malformación de la cola, edema pericárdico, escoliosis, deformación y edema del saco. Las malformaciones totales se expresaron como el porcentaje de embriones con al menos una malformación en comparación con el control. Se registraron las alteraciones del desarrollo embrionario presentadas por la exposición a los fármacos y sus mezclas en cada tiempo de exposición, y con estos datos se contruyeron las curvas de concentración-respuesta para PCM, CPX y sus mezclas binarias.

#### **9.6. Evaluación de estrés oxidativo en embriones de pez cebra**

Para esta prueba se utilizaron 40 sistemas. Los sistemas consistían en un gramo de embriones de pez cebra (correspondiente a 1600 embriones) en 4 L de agua. A cada sistema se le añadieron las concentraciones ambientalmente relevantes de PCM, CPX y las mezclas. Los sistemas se mantuvieron a temperatura constante ( $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). A las 72 hpf y 96 hpf, se seleccionaron al azar 800 embriones y se homogeneizaron con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) a 12,500 rpm. Los tiempos de exposición se seleccionaron teniendo en cuenta que en ese momento las larvas ya habían eclosionado y su



sistema enzimático antioxidante ya estaba funcionando. Para la evaluación del estrés oxidativo se determinaron los siguientes biomarcadores de oxidación celular: nivel de lipoperoxidación (Buege & Aust, 1978), contenido de hidroperóxidos (Jiang et al., 1992) y proteínas carboniladas (Levine et al., 1994). Además de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (Misra & Fridovich, 1972), catalasa (Radi et al., 1991) y glutatión peroxidasa (Günzler & Flohé, 1985, modificado por Stephenson, (2000)). Todos los resultados se realizaron teniendo en cuenta el contenido de proteínas determinado por el método de Bradford, (1976). Los experimentos se realizaron por triplicado.

### **9.7. Índice integrado de respuesta a los biomarcadores (IBR)**

Se empleó el índice integrado de respuesta a los biomarcadores para analizar la influencia de los biomarcadores de estrés oxidativo en cada una de las concentraciones probadas y relevantes para el medio ambiente de PCM, CPX y sus respectivas mezclas binarias (Sanchez et al., 2013). Para la determinación del IBR, se compararon los biomarcadores de cada fármaco evaluado y de las mezclas ( $X_i$ ) con los biomarcadores del grupo control ( $X_o$ ). La relación entre  $X_i$  y  $X_o$  se transformó en logaritmo ( $Y_i$ ) para reducir la varianza. Posteriormente los valores de  $Y_i$  se estandarizaron aplicando la fórmula  $Z_i = (Y_i - \mu) / s$ , utilizando la media ( $\mu$ ) y desviación estándar ( $s$ ) de  $Y_i$ . A continuación se calculó el índice de desviación del biomarcador ( $A$ ) mediante la diferencia entre  $Z_i$  y  $Z_o$ . Por último, los valores de  $A$  se trazaron en gráficos de estrella que representaban las respuestas integradas



de los biomarcadores. Además, se sumó el valor absoluto de  $A$  de cada biomarcador para obtener el IBR.

### **9.8. Criterios de trazabilidad y validez de las pruebas**

Para garantizar la trazabilidad de los resultados, sólo se utilizaron lotes de huevos en los que la tasa de fecundación era superior al 90%. Asimismo, el grupo control no mostró más de un 2% de alteraciones en su desarrollo en todos los tiempos de exposición.

### **9.9. Aprobación ética**

Esta investigación fue evaluada y aprobada por el Comité de Ética e Investigación de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) con el fin de garantizar que el experimento se realizara de acuerdo con las normas y lineamientos institucionales para el cuidado de los animales (ID de aprobación UAEM.CEI.DCTF.REC.078.2020). También se consideraron las disposiciones referidas en la norma oficial mexicana sobre cría, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### **9.10. Análisis de datos**

La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) y la concentración efectiva que induce el 50% de malformaciones ( $EC_{50}$ ) se calcularon mediante un análisis probit con regresión lineal de máxima verosimilitud (EPA Analysis Program v1.5). El índice teratogénico (IT) se obtuvo mediante la siguiente ecuación,  $IT = CL_{50}/EC_{50}$ .



Se realizó una prueba t de Student (de una cola) para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento y los controles ( $p < 0.05$ , software IBM SPSS Statistics 22). Los estadísticos se realizaron sobre la base de los embriones afectados (embriones con efectos letales o teratogénicos); en primer lugar, se registraron las puntuaciones para cada concentración de PCM, CPX y mezclas binarias, luego se tomaron para el control y finalmente se realizó una comparación mediante la prueba t.

Los datos de los biomarcadores de estrés oxidativo se examinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, considerencio como factores el tiempo (A) y la concentración (B). Las variaciones entre las medias se examinaron con el método de Student-Newman-Keuls, usando el software SigmaPlot 12.3. Todos los biomarcadores de estrés oxidativo pasaron la prueba de normalidad.



## 10. RESULTADOS

### 10.1. Pueba de embrioletalidad

Paracetamol, Ciprofloxacino y las mezclas binarias mostraron un comportamiento dependiente de la concentración en el número de embriones muertos y malformados. El valor de  $CL_{50}$  de PCM fue de  $736.9 \mu\text{gL}^{-1}$  con intervalos de confianza del 95% ( $647.2 - 853.9 \mu\text{gL}^{-1}$ ). La  $CL_{50}$  de CPX fue de  $35.4 \mu\text{gL}^{-1}$  ( $29.2 - 47.9 \mu\text{gL}^{-1}$ ). Los resultados de la mezcla de los dos fármacos indicaron que la mezcla M4 mostró el mayor índice embrioletal al causar la muerte del 75% de los embriones. La  $EC_{50}$  de PCM fue de  $438.8 \mu\text{gL}^{-1}$  y la de CPX de  $18.2 \mu\text{gL}^{-1}$  con intervalos de confianza del 95% de  $302.6 - 569.5 \mu\text{gL}^{-1}$  y  $16.1 - 20.4 \mu\text{gL}^{-1}$ , respectivamente. Los índices teratogénicos fueron de 1.6 para PCM y 1.9 para CPX, que según los criterios de Weigt et al., 2011, fueron clasificados como teratogénicos. La mezcla M4 presentó el mayor número de embriones malformados (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Tasas de mortalidad y malformaciones por concentraciones ambientalmente relevantes de PCM, CPX y sus mezclas binarias en embriones de *Danio rerio*.

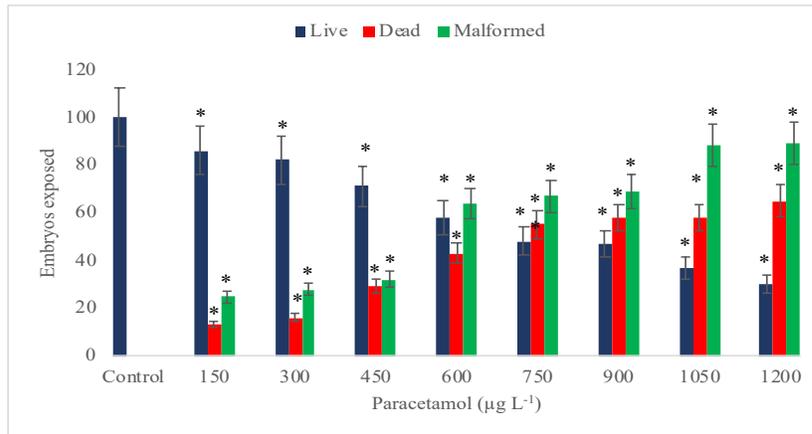
Paracetamol				Ciprofloxacina				Mezclas			
$\mu\text{gL}^{-1}$	Vivos %	Muertos %	Malformados %	$\mu\text{gL}^{-1}$	Vivos %	Muertos %	Malformados %	PCM-CPX	Vivos %	Muertos %	Malformados %
Control	100.0	0.0	0.0	Control	100	0.0	0.0	Control	100	0.0	0.0
150	86.1	13.9	25.0	5	91.7	8.3	15.3	M1	65.3	34.7	43.1
300	83.3	16.7	29.2	10	75.0	25.0	20.8	M2	48.6	51.4	54.2
450	70.8	29.2	33.3	15	70.8	29.2	43.1	M3	38.9	61.1	68.1
600	56.9	43.1	63.9	20	69.4	30.6	52.8	M4	25.0	75.0	93.1
750	45.8	54.2	68.1	25	55.6	44.4	58.3				
900	43.1	56.9	75.0	30	55.6	44.4	65.3				
1050	38.9	61.1	87.5	35	51.4	48.6	76.4				
1200	31.9	68.1	88.9	40	45.8	54.2	83.3				
		$CL_{50} = [736.9]$				$CL_{50} = [35.4]$					
		CI= [647.2-853.9]				CI= [29.2-47.9]					
		$EC_{50} = [438.8]$				$EC_{50} = [18.2]$					
		CI=[302.6-569.5]				CI= [16.1-20.4]					
		<b>IT= 1.6</b>				<b>IT= 1.9</b>					



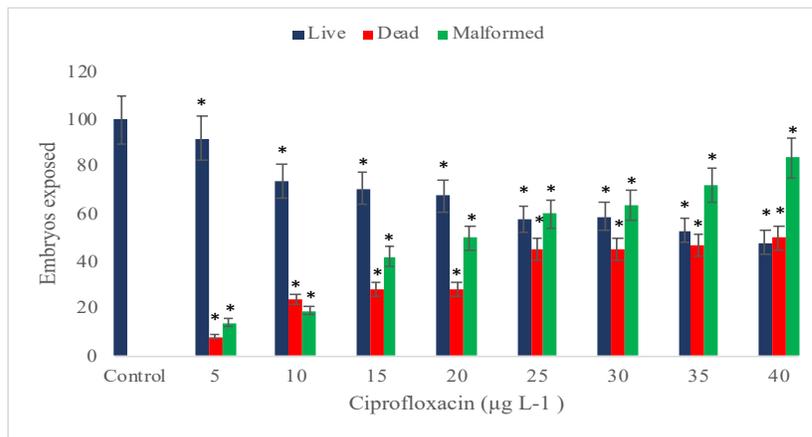
La **Figura 4**. Muestra las proporciones de embriones vivos, muertos y malformados para cada concentración de PCM, CPX y sus mezclas binarias. En todos los casos, el número de embriones vivos disminuyó con el aumento de la concentración del fármaco. El CPX tuvo tasas de mortalidad más bajas. Sin embargo, las mezclas PCM-CPX mostraron las tasas más altas de muertes y malformaciones en comparación con los fármacos individuales. La mezcla M4 mostró un menos número de embriones vivos.



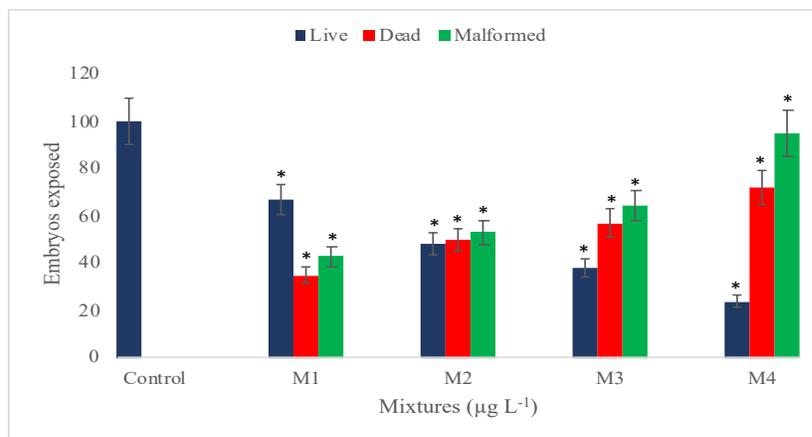
A)



B)



C)

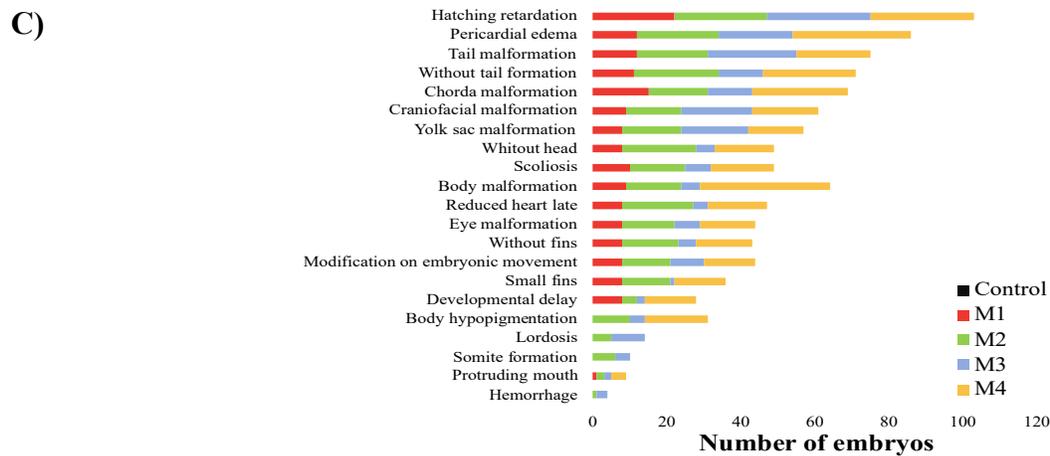
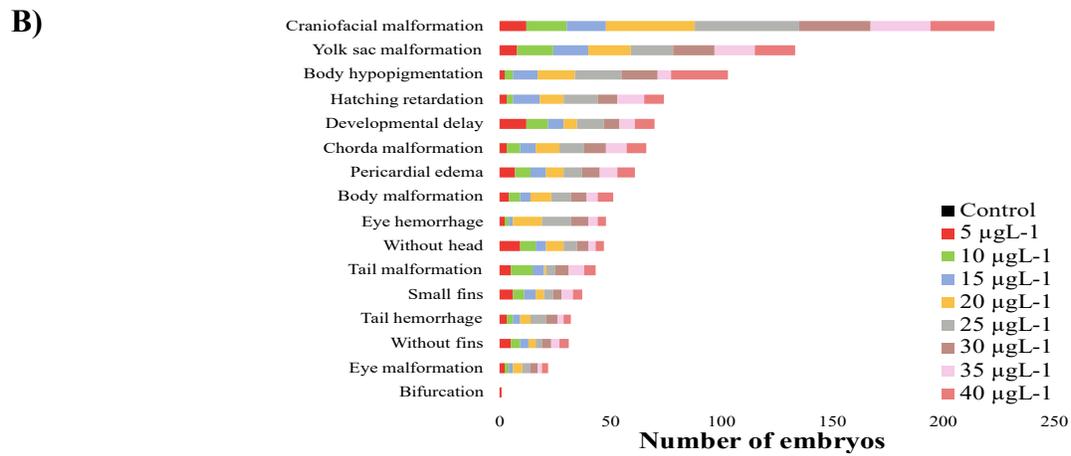
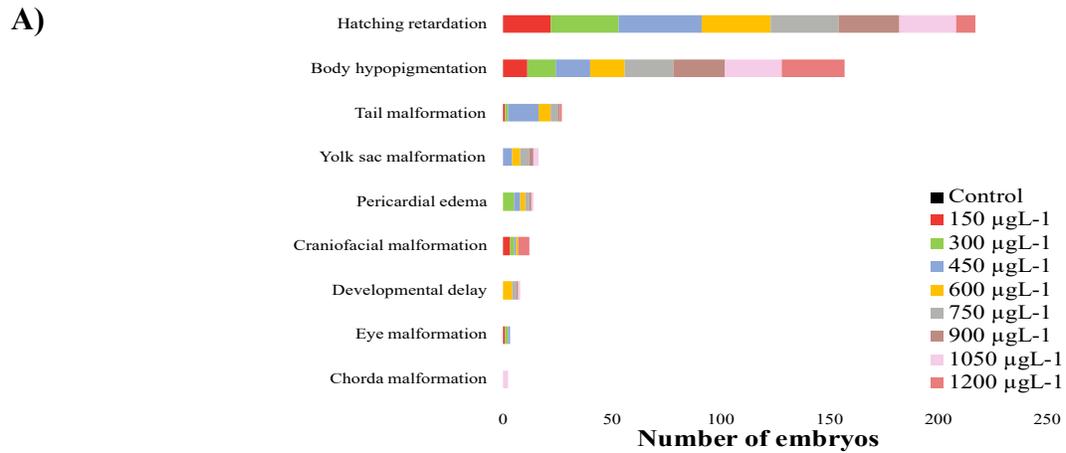


**Figura 4.** Efectos sobre la supervivencia y las malformaciones de embriones de *D. rerio* expuestos a A) PCM, B) CPX y C) Mezclas binarias de PCM-CPX. Los valores son la media de tres réplicas ± SE. Diferencias significativas en relación con: \*grupo control; ANOVA de dos vías (p<0.05).



## **10.2. Alteraciones en el desarrollo de embriones de *D. rerio* por PCM, CPX y su mezcla binaria**

La **Figura 5** muestra el número de embriones que presentaron malformaciones generadas por la exposición a diferentes concentraciones de PCM, CPX y su mezcla. El PCM indujo nueve malformaciones diferentes. Retraso en la eclosión y la hipopigmentación corporal fueron las malformaciones más frecuentes en los embriones expuestos a cada una de las concentraciones de PCM evaluadas. La exposición a diferentes concentraciones de CPX generó 16 malformaciones diferentes. Las malformaciones craneofaciales y del saco vitelino fueron las más frecuentes en los embriones expuestos. Las mezclas PCM-CPX mostraron el mayor número de malformaciones diferentes. El retraso en la eclosión y edema pericárdico fueron las más frecuentes en los embriones expuestos a la mezcla binaria. La mezcla M4 generó el mayor número de embriones con malformaciones. La mezcla M1 presentó el menor número de embriones con malformaciones.



**Figura 5.** Principales malformaciones inducidas por A) PCM, B) CPX y C) Mezclas PCM-CPX en embriones de *D. rerio*.

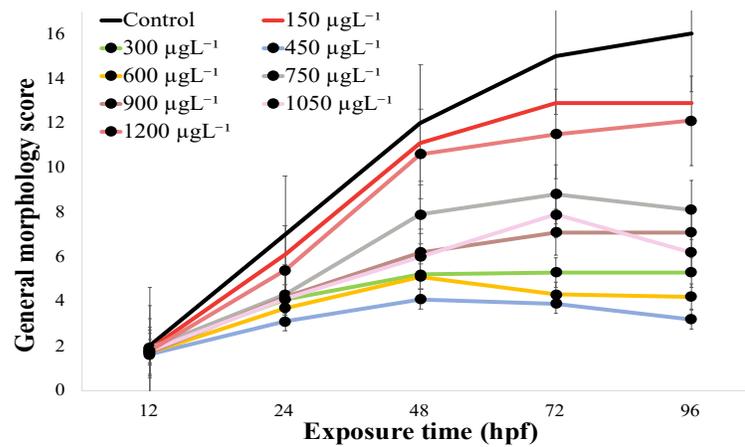


### **10.3. Puntuación del desarrollo embrionario a diferentes tiempos y concentraciones de PCM, CPX y sus mezclas binarias**

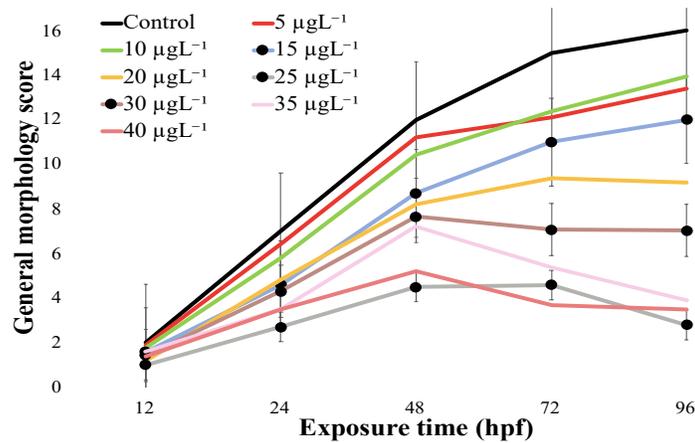
La **Figura 6** muestra las curvas de concentración-efecto de PCM, CPX y las cuatro mezclas binarias PCM-CPX, en referencia al desarrollo normal de embriones de pez cebra según la puntuación de Hermsen et al., 2011. En todos los casos se mostró una disminución de la puntuación respecto a los organismos control, debido a las diferentes alteraciones morfológicas presentadas. Las concentraciones de 300-1200 ugL-1 de PCM mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). En el caso de CPX, la concentración que mostró mayor influencia en el desarrollo embrionario fue la de 25 ugL-1 y las concentraciones a partir de 15 ugL-1 mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). En el caso de las mezclas binarias de PCM-CPX, M4 fue la única mezcla que mostró diferencias significativas con respecto al grupo control.



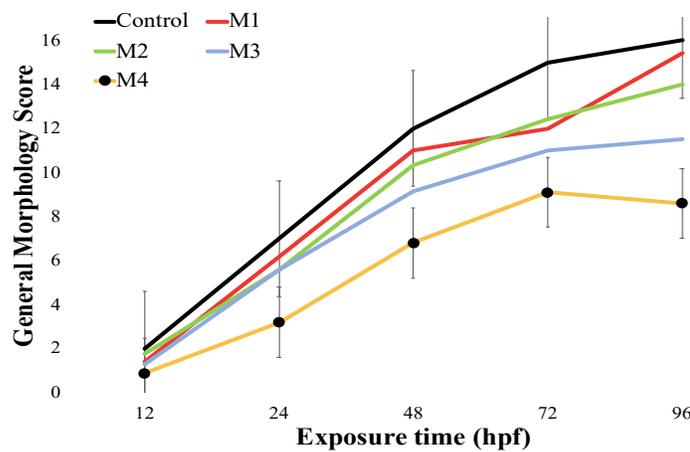
A)



B)



C)

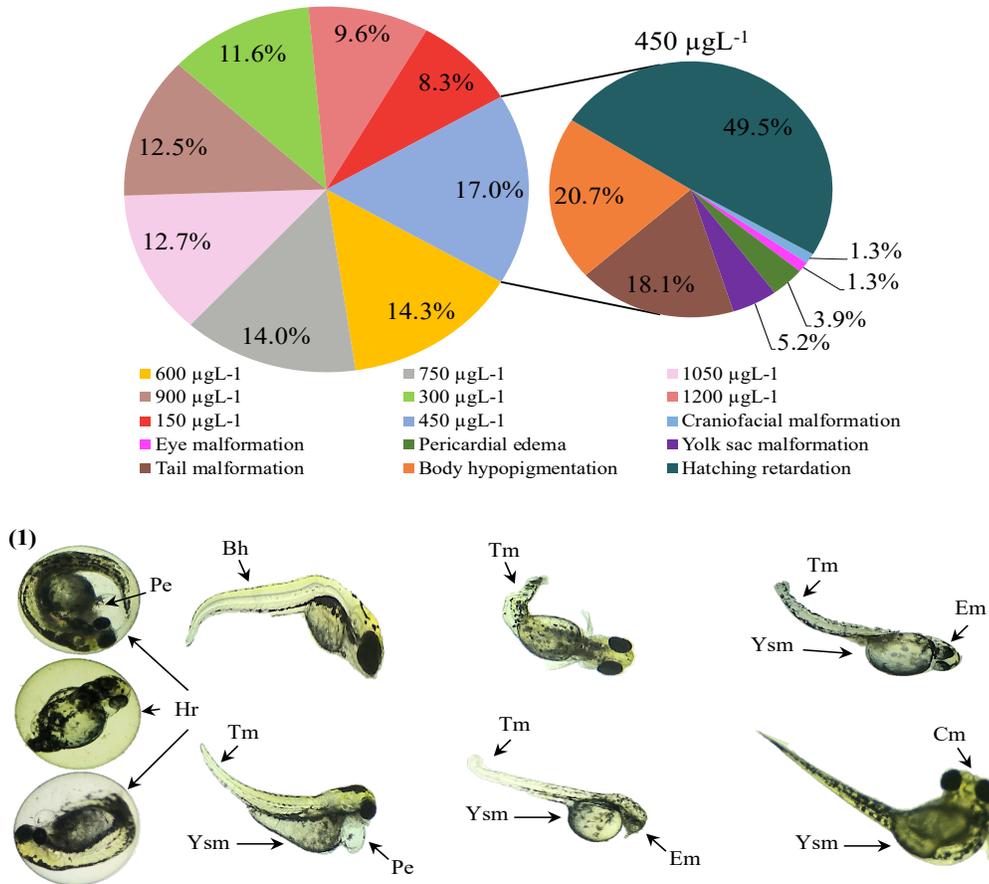


**Figura 6.** Curvas de concentración-efecto de PCM, CPX y sus mezclas binarias en embriones de *D. rerio*. Todas las concentraciones de PCM, CPX y sus mezclas fueron significativamente diferentes del grupo control ( $p < 0.05$ ). Prueba t de Student.

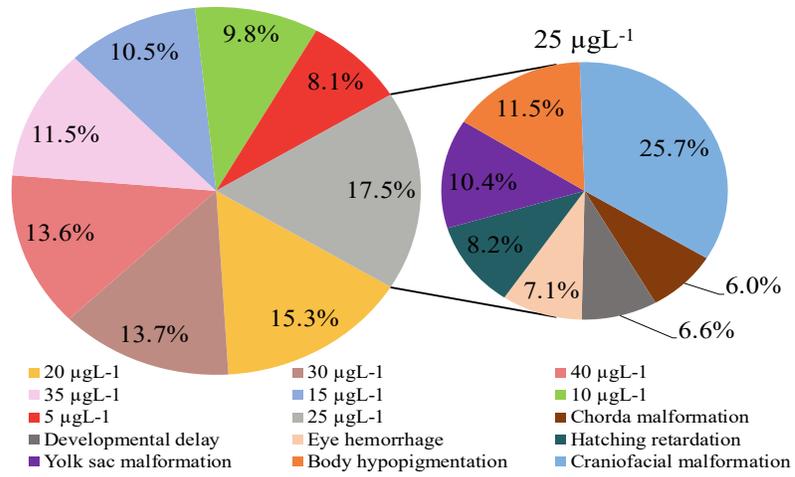
### 10.4. Efectos teratogénicos inducidos por PCM, CPX y sus mezclas binarias

La **Figura 7** muestra la proporción de malformaciones totales que se produjeron en cada concentración de PCM, CPX y sus mezclas. En PCM la mayor proporción de malformaciones se produjo a 450  $\mu\text{g/L}$  y retraso en la eclosión fue la malformación más frecuente asociada a esta concentración. La mayor proporción de malformaciones por CPX se produjo a los 25  $\mu\text{g/L}$  y la malformación craneofacial fue la más frecuente asociada a esta concentración. En cuando a las mezclas, la mezcl M4 presentó la mayor proporción de malformaciones y malformación de cuerpo fue la más frecuente en esta mezcla.

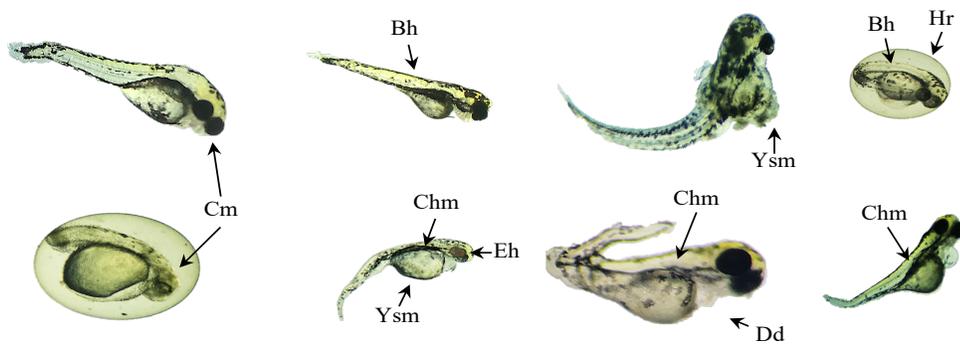
A)



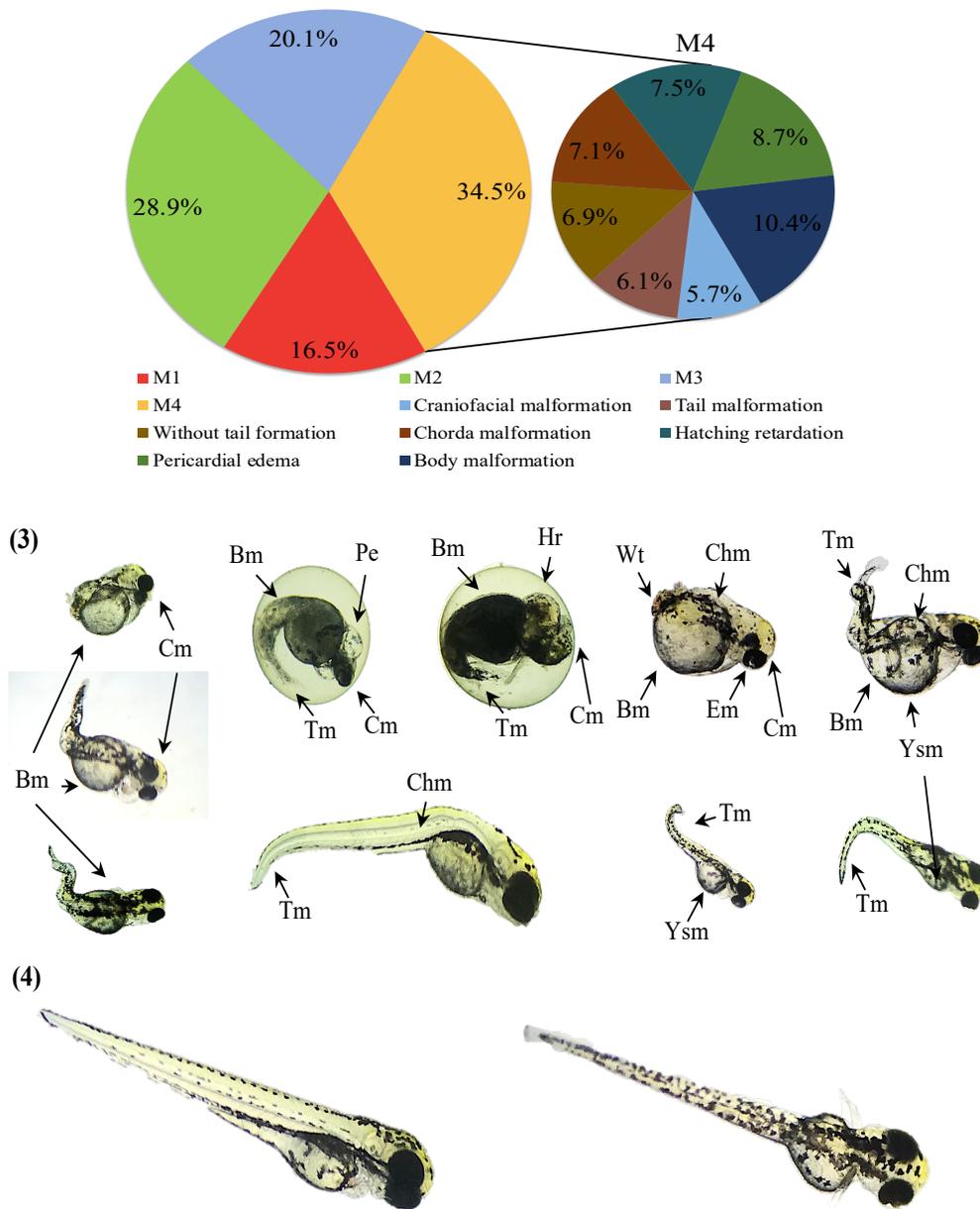
**B)**



(2)



C)



**Figura 7.** Proporción del número de malformaciones por concentración y principales malformaciones en embriones de *D. rerio* a la concentración crítica de A) PCM, B) CPX y C) Mezclas PCM-CPX.



\*No se presentan las malformaciones inferiores al 5.0% en **B)** y **C)**.

Representación de los principales efectos teratogénicos a las 96 hpf a la concentración crítica de **(1)** PCM, **(2)** CPX y **(3)** Mezcla M4. **(4)** Organismos control a las 96 hpf.

**Chm** = Malformación de corda; **Dd**= Retraso en el Desarrollo; **Eh**= Hemorragia en ojo; **Hr**= Retardo en la eclosión; **Bh**= Hipopigmentación de cuerpo; **Tm**= Malformación de cola; **Ysm**= Malformación de saco vitelino; **Pe**= Edema pericárdico; **Em**= Malformación ocular; **Cm**= Malformación craneofacial; **Bm**= Malformación de cuerpo; **Wt**= Sin formación de cola; **Tm**= Malformación de cola.

### 10.5. Biomarcadores de oxidación celular

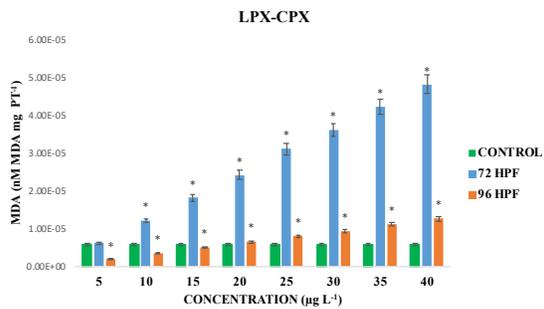
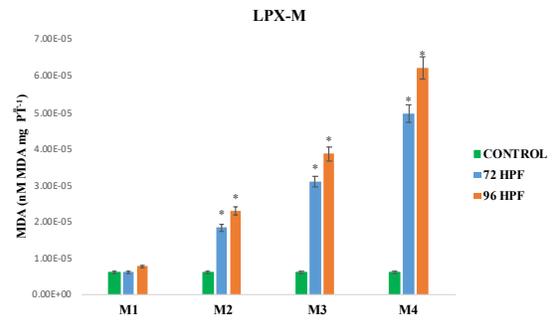
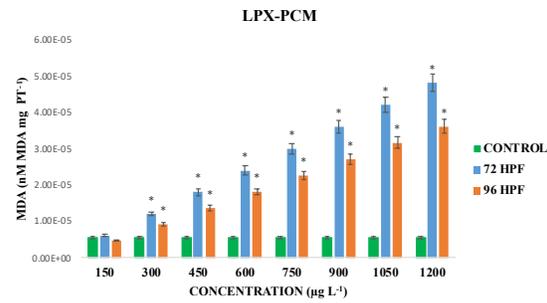
La **Figura 8** muestra los resultados de la oxidación celular. Los resultados de lipoperoxidación (LPX) se muestran en la **Figura 5A**. Se encontraron incrementos estadísticamente significativos con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) de forma dependiente de la concentración. Para el PCM se observaron aumentos a las 72 y 96 hpf respectivamente, en comparación con el grupo control a concentraciones de: 150  $\mu\text{gL}^{-1}$  (1.09 y 0.84 veces), 300  $\mu\text{gL}^{-1}$  (2.17 y 1.65 veces), 450  $\mu\text{gL}^{-1}$  (3.24 y 2.45 veces), 600  $\mu\text{gL}^{-1}$  (4.32 y 3.26 veces), 750  $\mu\text{gL}^{-1}$  (5.39 y 4.07 veces), 900  $\mu\text{gL}^{-1}$  (6.47 y 4.87 veces), 1050  $\mu\text{gL}^{-1}$  (7.54 y 5.68 veces) y 1200  $\mu\text{gL}^{-1}$  (8.62 y 6.49 veces). En el caso de CPX, se observó la misma tendencia, los aumentos de tiempos con respecto al control a las 72 y 96 hpf fueron respectivamente de 5  $\mu\text{gL}^{-1}$  (0.108 y 0.334), 10  $\mu\text{gL}^{-1}$  (0.213 y 0.616), 15  $\mu\text{gL}^{-1}$  (0.319 y 0.880), 20  $\mu\text{gL}^{-1}$  (0.425 y 1.44), 25  $\mu\text{gL}^{-1}$  (0.549 y 1.40), 30  $\mu\text{gL}^{-1}$  (0.636 y 1.65), 35  $\mu\text{gL}^{-1}$  (0.745 y 1.97) y 40  $\mu\text{gL}^{-1}$  (0.849 y 2.21). Finalmente, para las mezclas binarias PCM-CPX hubo una diferencia



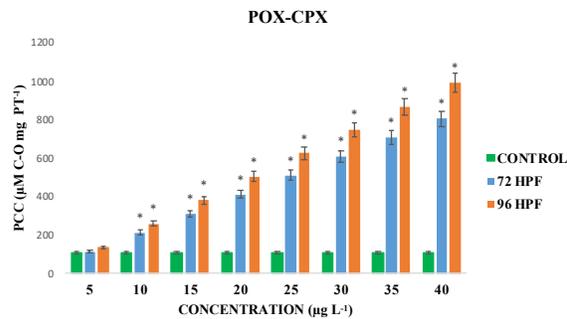
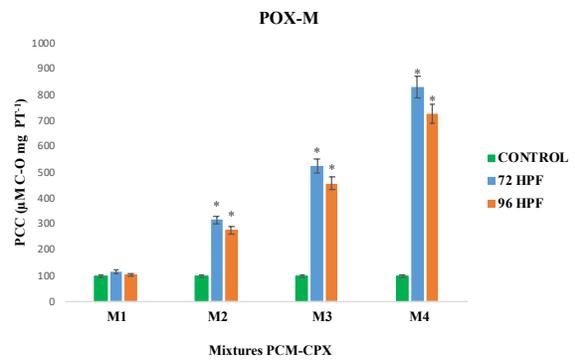
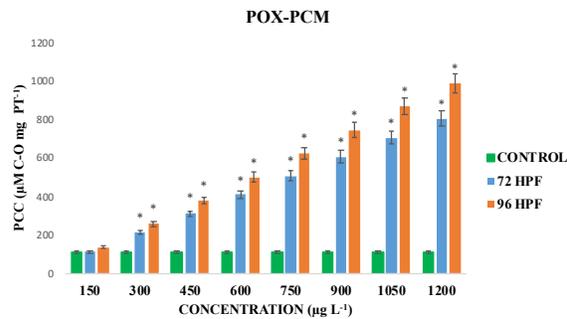
significativa con respecto al grupo de control a las 72 y 96 hpf respectivamente de: M2 (3.0 y 3.74), M3 (5.05 y 6.31), M4 (8.11 y 10.14). Los resultados de proteínas carboniladas (POX) se muestran en la **Figura 5B**. Se encontraron aumentos significativos con respecto al grupo de control ( $P < 0.05$ ) a las 72 y 96 hpf de 1.02 y 1.23; 1.93 y 2.35; 2.83 y 3.46; 3.73 y 4.57; 4.62 y 5.68; 5.52 y 6.78; 6.42 y 7.89; y 7.31 y 8.99 veces, respectivamente para 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 y 1200  $\mu\text{gL}^{-1}$  de PCM. Para CPX de 1.02 y 1.24; 1.93 y 2.34; 2.83 y 3.45; 3.73 y 4.56; 4.62 y 5.64; 5.49 y 6.74; 6.38 y 7.84; y 7.26 y 8.92 veces respectivamente a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Finalmente, para las mezclas binarias hubo diferencia para M2 (3.16 y 2.77 veces), M3 (5.24 y 4.58 veces) y M4 (8.34 y 7.28 veces). Los resultados de contenido de hidroperóxidos (HPX) se muestran en la **Figura 5C**. Se observaron incrementos a las 72 y 96 hpf respectivamente en comparación con el control para PCM a concentraciones de: 150  $\mu\text{gL}^{-1}$  (1.63 y 1.16 veces), 300  $\mu\text{gL}^{-1}$  (3.16 y 2.20 veces), 450  $\mu\text{gL}^{-1}$  (4.70 y 3.24 veces), 600  $\mu\text{gL}^{-1}$  (6.23 y 4.29 veces), 750  $\mu\text{gL}^{-1}$  (7.76 y 5.33 veces), 900  $\mu\text{gL}^{-1}$  (9.30 y 6.37 veces), 1050  $\mu\text{gL}^{-1}$  (9.79 y 7.41 veces) y 1200  $\mu\text{gL}^{-1}$  (9.87 y 8.45 veces). En el caso de CPX, se observó la misma tendencia, los aumentos de tiempos con respecto al control a las 72 y 96 hpf fueron respectivamente de 5  $\mu\text{gL}^{-1}$  (1.65 y 1.20), 10  $\mu\text{gL}^{-1}$  (3.20 y 2.22), 15  $\mu\text{gL}^{-1}$  (4.74 y 3.26), 20  $\mu\text{gL}^{-1}$  (6.29 y 4.31), 25  $\mu\text{gL}^{-1}$  (7.81 y 5.37), 30  $\mu\text{gL}^{-1}$  (9.34 y 6.41), 35  $\mu\text{gL}^{-1}$  (9.42 y 7.45) y 40  $\mu\text{gL}^{-1}$  (9.70 y 8.49). Finalmente, para las mezclas binarias PCM-CPX hubo una diferencia significativa con respecto al grupo control a las 72 y 96 hpf respectivamente de: M2 (3.16 y 3.10), M3 (5.28 y 5.16), M4 (8.42 y 8.22).



A)

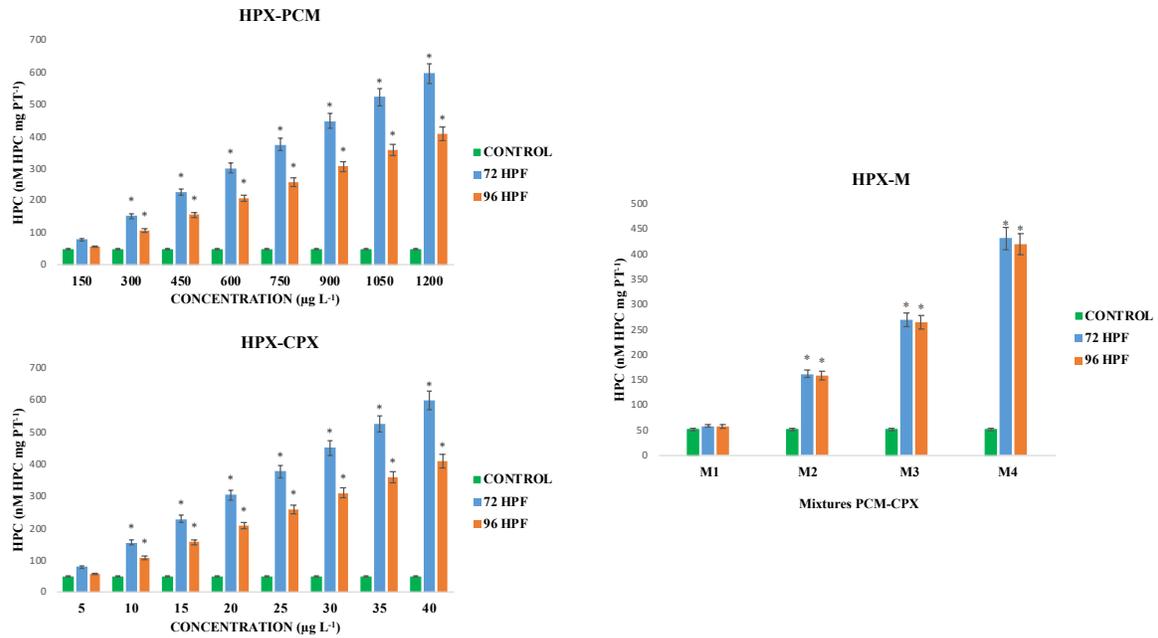


B)





C)



**Figura 8. A)** Peroxidación lipídica (LPX), **B)** Contenido de proteínas carboniladas (PCC) y **C)** Contenido de hidroperóxidos (HPX) en embriones de pez cebra *Danio rerio* expuestos a ocho concentraciones diferentes de PCM, CPX y sus mezclas binarias a las 72 y 96 hpf. Los valores son la media de tres réplicas  $\pm$  SE. Diferencias significativas con relación con: \*grupo control; ANOVA de dos vías ( $p < 0.05$ ).



## 10.6. Biomarcadores de defensa antioxidante

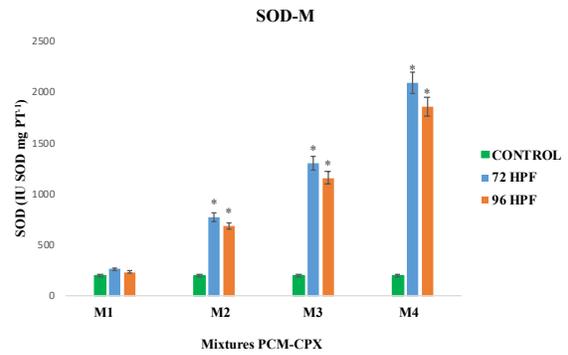
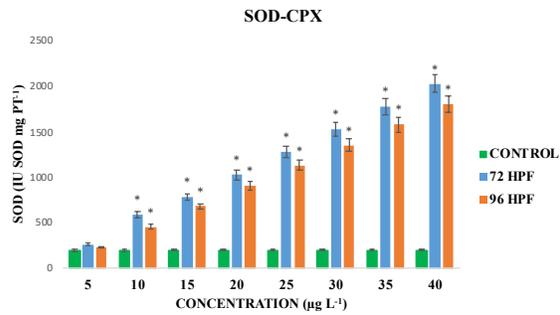
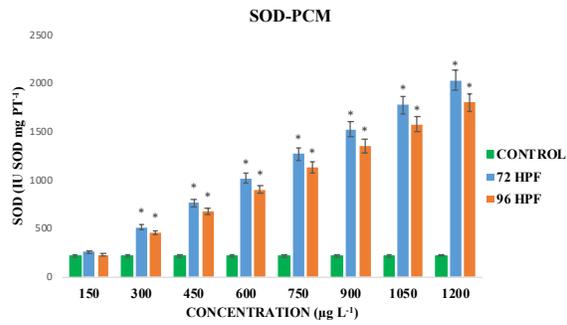
La **Figura 9** muestra los resultados de la actividad antioxidante. Los resultados de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se muestran en la **Figura 6A**. Se encontraron incrementos estadísticamente significativos con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ) de forma dependiente de la concentración. En el caso de PCM se observaron aumentos a las 72 y 96 hpf con respecto al control a concentraciones de:  $150 \mu\text{gL}^{-1}$  (1.16 y 1.04 veces),  $300 \mu\text{gL}^{-1}$  (2.33 y 2.07 veces),  $450 \mu\text{gL}^{-1}$  (3.49 y 3.10 veces),  $600 \mu\text{gL}^{-1}$  (4.64 y 4.13 veces),  $750 \mu\text{gL}^{-1}$  (5.80 y 5.15 veces),  $900 \mu\text{gL}^{-1}$  (6.96 y 6.18 veces),  $1050 \mu\text{gL}^{-1}$  (8.12 y 7.21 veces) y  $1200 \mu\text{gL}^{-1}$  (9.27 y 8.23 veces). En el caso de CPX, se observó la misma tendencia, los aumentos de los tiempos con respecto al control a las 72 y 96 hpf fueron respectivamente  $5 \mu\text{gL}^{-1}$  (1.21 y 1.05),  $10 \mu\text{gL}^{-1}$  (2.69 y 2.09),  $15 \mu\text{gL}^{-1}$  (3.58 y 3.11),  $20 \mu\text{gL}^{-1}$  (4.70 y 4.15),  $25 \mu\text{gL}^{-1}$  (5.84 y 5.17),  $30 \mu\text{gL}^{-1}$  (7.0 y 6.20),  $35 \mu\text{gL}^{-1}$  (8.14 y 7.22) y  $40 \mu\text{gL}^{-1}$  (9.29 y 8.24). Finalmente, para las mezclas binarias PCM-CPX hubo una diferencia significativa con respecto al grupo de control a las 72 y 96 hpf respectivamente de: M2 (3.90 y 3.46), M3 (6.58 y 5.85), M4 (10.57 y 9.38). Los resultados de la actividad de la catalasa (CAT) se muestran en la **Figura 6B**. Se encontraron aumentos significativos con respecto al grupo de control ( $P < 0,05$ ) a las 72 y 96 hpf de 0.94 y 1.14; 1.86 y 2.24; 2.79 y 3.34; 3.71 y 4.44; 4.64 y 5.54; 5.56 y 6.64; 6.49 y 7.74; y 7.41 y 8.83 veces, respectivamente para 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 y  $1200 \mu\text{gL}^{-1}$  de PCM. Para CPX de 1.25 y 1.14; 2.48 y 2.24; 3.72 y 3.34; 4.95 y 4.44; 6.18 y 5.54; 7.42 y 6.64; 8.65 y 7.73; y 9.88 y 8.83 veces respectivamente a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y  $40 \mu\text{gL}^{-1}$ . Finalmente, para las mezclas binarias hubo diferencia



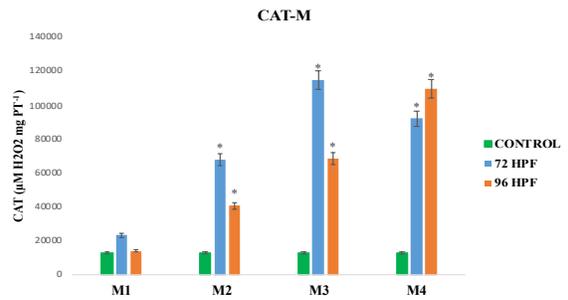
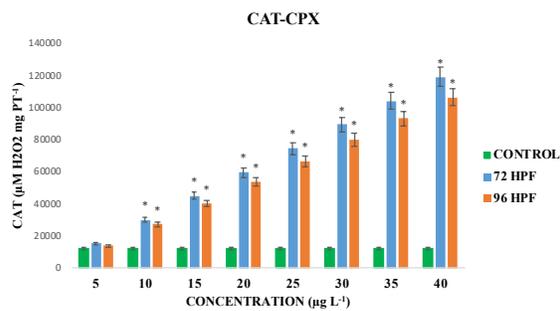
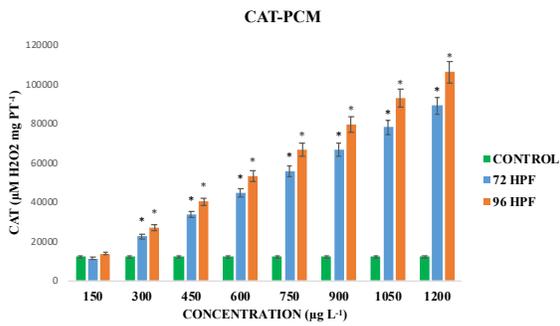
para M2 (5.18 y 3.10 veces) , M3 (8.73 y 4.21 veces) y M4 (8.75 y 8.35 veces). Los resultados de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX) se muestran en la **Figura 6C**. Para el PCM se observaron incrementos a las 72 y 96 hpf respectivamente con respecto al control para PCM a concentraciones de: 150  $\mu\text{gL}^{-1}$  (1.46 y 1.05 veces), 300  $\mu\text{gL}^{-1}$  (2.92 y 2.09 veces), 450  $\mu\text{gL}^{-1}$  (4.38 y 3.14 veces), 600  $\mu\text{gL}^{-1}$  (5.84 y 4.18 veces), 750  $\mu\text{gL}^{-1}$  (7.30 y 5.22 veces), 900  $\mu\text{gL}^{-1}$  (8.75 y 6.26 veces), 1050  $\mu\text{gL}^{-1}$  (8.82 y 7.30 veces) y 1200  $\mu\text{gL}^{-1}$  (9.14 y 8.34 veces). En el caso de la CPX, se observó la misma tendencia, los aumentos de tiempos con respecto al control a las 72 y 96 hpf fueron respectivamente 5  $\mu\text{gL}^{-1}$  (1.48 y 1.07), 10  $\mu\text{gL}^{-1}$  (3.19 y 2.12), 15  $\mu\text{gL}^{-1}$  (4.51 y 3.16) , 20  $\mu\text{gL}^{-1}$  (5.85 y 4.20) , 25  $\mu\text{gL}^{-1}$  (7.30 y 5.24), 30  $\mu\text{gL}^{-1}$  (8.77 y 6.30) , 35  $\mu\text{gL}^{-1}$  (8.83 y 7.32) y 40  $\mu\text{gL}^{-1}$  (9.19 y 8.65). Finalmente, para las mezclas binarias PCM-CPX hubo una diferencia significativa con respecto al grupo de control a las 72 y 96 hpf respectivamente de: M2 (4.38 y 3.14) , M3 (7.40 y 5.29), M4 (9.14 y 8.49).



A)

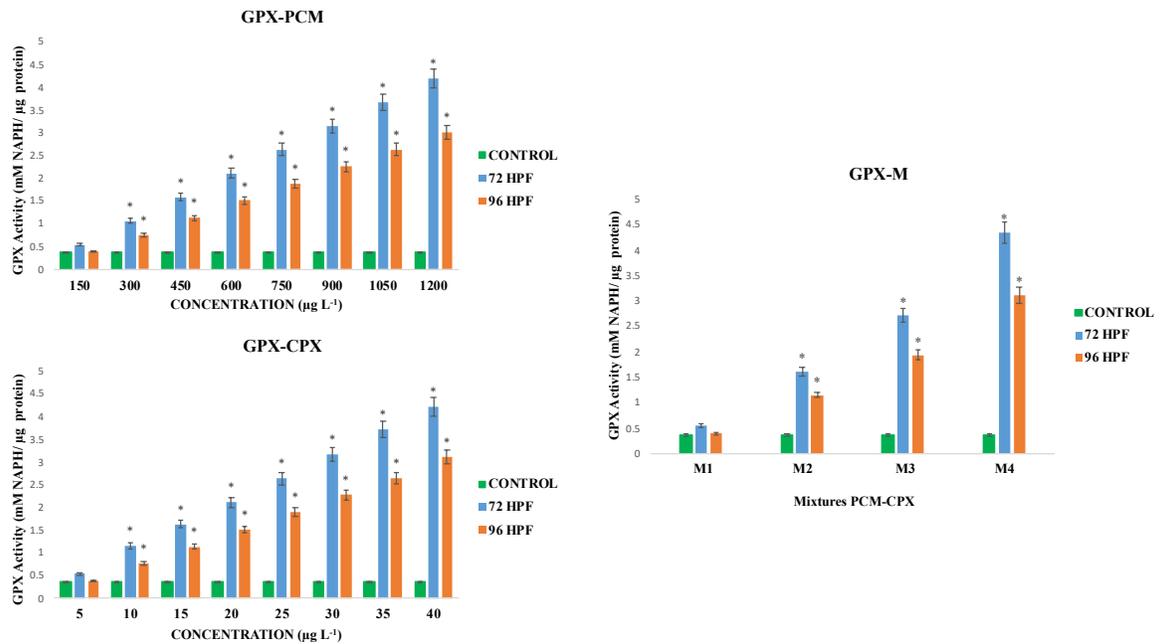


B)





C)



**Figura 9.** A) Actividad de la superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión peroxidasa (GPX) en embriones de *Danio rerio* expuestos a ocho concentraciones diferentes de PCM, CPX y sus mezclas binarias a las 72 y 96 hpf. Los valores son la media de tres réplicas  $\pm$  SE. Diferencias significativas en relación con: \*grupo control; ANOVA de dos vías ( $p < 0.05$ ).

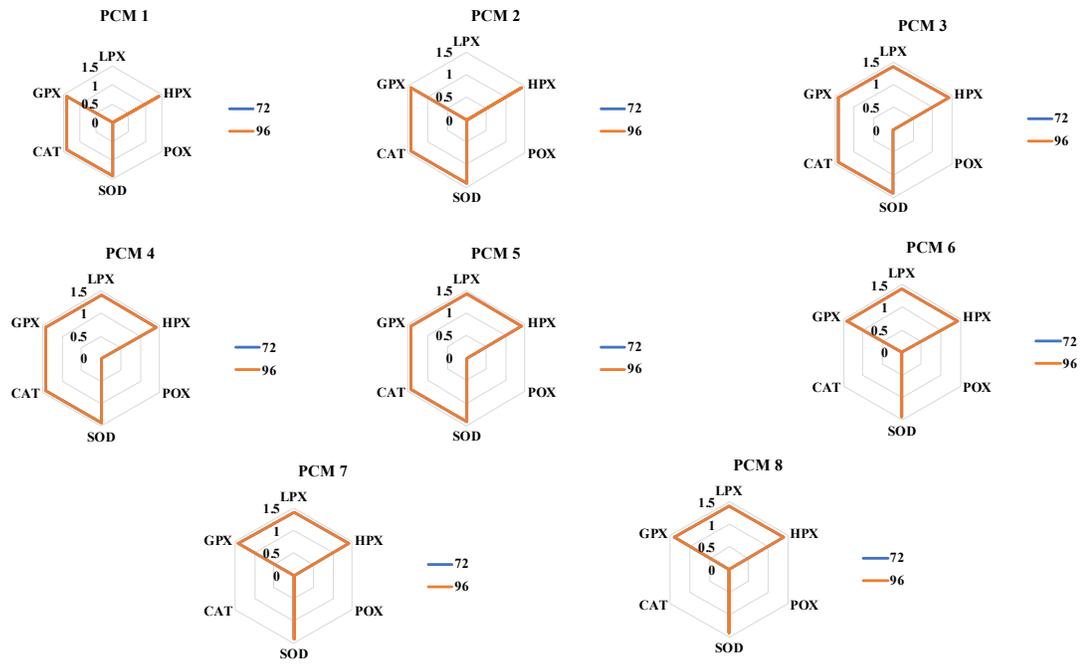


### 10.7. Índice de respuesta integral a los biomarcadores (IBRv2)

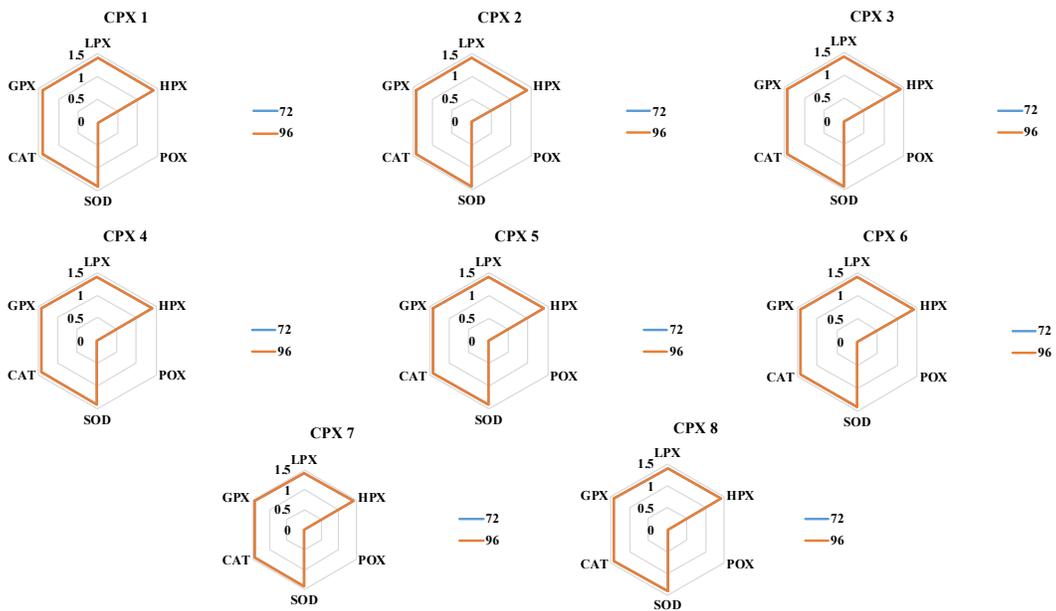
La **Figura 10** muestra el análisis de los biomarcadores integrados para PCM, CPX y sus mezclas binarias. En el caso de PCM (**Figura 7A**) nuestro análisis IBR indicó que a bajas concentraciones las enzimas antioxidantes tuvieron más influencia en los embriones que los biomarcadores de daño oxidativo. Sin embargo, a medida que aumentaba la concentración los biomarcadores de daño oxidativo (LPX y HPX) tienen más impacto en los embriones que las enzimas antioxidantes. En cuanto a CPX (**Figura 7B**), podemos observar que, independientemente de la concentración de este fármaco, las enzimas antioxidantes siguen teniendo más influencia sobre los embriones que los biomarcadores de daño oxidativo. Finalmente, en el caso de las mezclas binarias (PCM-CPX) (**Figura 7C**), podemos observar que al igual que el PCM, a medida que aumenta la concentración, los biomarcadores de daño oxidativo (HPX y POX) tienen más impacto en los embriones que las enzimas antioxidantes.



A)

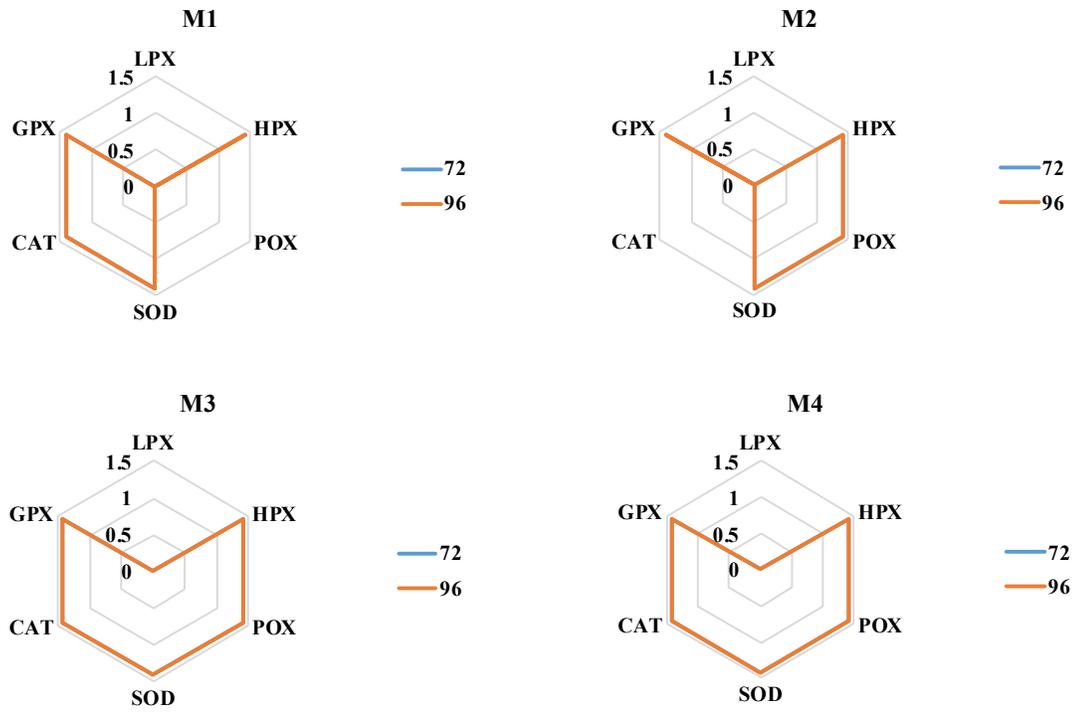


B)





C)



**Figura 10.** Análisis del índice de Respuesta Integral de Biomarcadores (IBRv2) realizado para evaluar los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo mencionados anteriormente, para cada concentración de **A)** PCM, **B)** CPX y **C)** Mezclas binarias de PCM-CPX a las 72 y 96 hpf. Cuanto mayor es el valor de IBR, mayor es el daño en el embrión.



## 11. DISCUSIÓN

En esta investigación se evaluaron los efectos tóxicos que el PCM, CPX y su mezcla indujeron en los embriones de *D. rerio*. De acuerdo con los resultados, las concentraciones ambientalmente relevantes de PCM, CPX y su mezcla produjeron diferentes malformaciones corporales en los embriones, afectando su integridad y en consecuencia aumentando su tasa de mortalidad. En el caso de PCM, estudios anteriores han demostrado que 100 ugL-1 de este fármaco indujo la muerte del 50% de los embriones de *Danio rerio*, tras 96 horas de exposición (David & Pancharatna, 2009). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que la concentración de 1200 ugL-1 de PCM indujo la muerte del 68% de los embriones de *Danio rerio*, después de 96 horas de exposición. Estos resultados sugieren que tanto las concentraciones bajas como las altas de PCM, pueden aumentar la tasa de mortalidad de los peces, y que los embriones de *Danio rerio* son altamente sensibles a los contaminantes como el PCM.

De acuerdo con Gutiérrez-Noya et al., 2021, la CL<sub>50</sub> de PCM en embriones de *Cyprinus carpio* fue de 1.29 ugL-1. Además, Cedron et al., 2020, establecieron que la CL<sub>50</sub> de PCM en embriones fue de 6.6 mM (997.6 mgL<sup>-1</sup>). Sin embargo, en este estudio, la CL<sub>50</sub> de PCM fue de 736 ugL-1.

Al igual que el PCM, el CPX puede inducir efectos embriotóxicos y teratogénicos en los peces. Zivna et al., (2016), por ejemplo, informaron que la exposición de embriones de *Cyprinus carpio* a 1000 y 3000 ugL-1 de este fármaco, provocó la muerte del 32% de los embriones. Por otro lado, en nuestro estudio, demostramos que el CPX alcanzó un valor de



CL<sub>50</sub> de 35.4 ugL-1. Por lo que se puede sugerir que los embriones de *Danio rerio* son más sensibles a CPX que los embriones de *Cyprinus carpio*.

Con respecto a la mezcla PCM-CPX observamos un aumento del número de embriones muertos y malformados en la mezcla 4 (1200 ugL-1 de PCM y 40 ugL-1 de CPX), alcanzando una tasa de malformación del 93.1%. En concordancia con nuestros resultados, Richards et al., (2004) informaron que la mezcla de CPX (6, 10 y 100 ugL-1) con otros fármacos como el ibuprofeno (6 ugL-1) y la fluoxetina (10 ugL-1) indujeron un aumento en la tasa de mortalidad y malformaciones del pez luna (*Leopomis gibbosus*).

Nuestros resultados demostraron que diferentes concentraciones de PCM, CPX y su mezcla PCM-CPX indujeron diferentes malformaciones en embriones de *Danio rerio*. En el caso particular de PCM, las principales malformaciones observadas en los embriones fueron: malformación craneofacial, malformación ocular, edema pericárdico, malformación de saco vitelino, malformación de cola, retraso en la eclosión e hipopigmentación corporal. De ellas, las más frecuentes fueron retraso en la eclosión e hipopigmentación corporal. Estos resultados son consistentes con los reportados por David & Pancharatna (2009), quienes demostraron que el PCM (1 – 100 ugL-1) indujo diferentes malformaciones (alteraciones en el proceso de eclosión, alteraciones en el crecimiento y desarrollo de los embriones, e hipopigmentación) en embriones de *Danio rerio*.

La hipopigmentación en los peces se debe a una afectación de las células responsables de la distribución del pigmento tanto en las células de la retina como en los melanóforos de la cabeza, cuerpo y saco vitelino. Según Cedron et al., 2020, el PCM (2.5 mM – 4.9 mM) puede



afectar a la síntesis de las células pigmentarias: melanocitos iridóforos y xantóforos que derivan de la cresta neural (NCC) en *Danio rerio*. En cuando a otras malformaciones, es bien sabido que PCM puede generar diferentes malformaciones en los peces debido a su capacidad de producir ROS. Las ROS producidas por el PCM se generan a través de la formación de NAPQI, durante el proceso de biotransformación de este fármaco. Las ROS incluyen el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), el anion superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que modulan diferentes procesos celulares en los organismos vertebrados. Además, los ROS actúan como mensajeros dentro de las células y pueden inducir el crecimiento, el desarrollo o la muerte celular. Sin embargo, cuando los organismos se exponen a algunos agentes tóxicos como el PCM, la producción de ROS aumenta, provocando un daño importante en las células y, en consecuencia, perturbando el desarrollo normal de los embriones. Así las ROS producidas por el PCM pueden afectar a las células del NCC, y luego inducir varias anomalías corporales (desarrollo anormal de la columna vertebral, malformación de saco vitelino, hipopigmentación, retraso del proceso de eclosión) en los peces.

La eclosión en los peces se produce mediante el movimiento del embrión desde las primeras horas de desarrollo (17 hpf). Estos movimientos surgen en la médula espinal y continúan hasta el desarrollo de las neuronas motoras de los nervios musculares (Brustein et al., 2003). Varios estudios han informado de un retraso en el proceso de eclosión inducido por PCM. David & Pancharatna (2009) informaron que el PCM (1, 10, 50 y 100  $\mu\text{g/L}$ ) indujo un importante retraso en el proceso de eclosión de *Danio rerio*. Además, señalaron que este retraso en la eclosión se prolongaba hasta las 120 hpf. Del mismo modo, Xia et al., 2017



establecieron que el ibuprofeno, el diclofenaco y el PCM (5-500 ugL-1) indujeron un retraso en el proceso de eclosión de *Danio rerio*, como resultado de una reducción de los movimientos del pez cebra durante sus primeras horas de desarrollo. De acuerdo con estos datos, demostramos que el PCM indujo un importante retraso en el proceso de eclosión de los embriones (**Figura 2A**).

En cuanto al CPX, demostramos que las principales malformaciones que este fármaco indujo en los embriones de *Danio rerio* fueron la malformación de saco vitelino y malformación craneofacial. El saco vitelino es un compartimento único en los embriones, rico en fosfolipoproteínas y con propiedades que facilitan la sorción de sustancias químicas o agentes externos. Además, se considera la fuente de nutrientes necesarios para el desarrollo del embrión (Fraher et al., 2016). En la literatura se ha reportado que el CPX puede reaccionar con las fosfolipoproteínas y formar aductos (S-H) modificando su estructura (Miyares et al., 2014; He et al., 2013).

Genes como SoxE, responsable del desarrollo normal del cuerpo, se expresan en el SNC. Sox9b, por ejemplo, participa en el desarrollo craneofacial, mientras que Sox10 es necesario para el desarrollo normal de las células pigmentarias, los ganglios espinales y las neuronas simpáticas, entéricas y gliales. Esto es digno de mención, ya que los ROS generados por CPX interrumpen las funciones de las células que forman el SNC y, por lo tanto, inducen diferentes malformaciones en los peces, como deformidades espinales, malformaciones del saco vitelino, malformaciones craneofaciales, malformaciones oculares e hipopigmentación. Zivna et al., 2016, por ejemplo, informaron que el CPX (100 – 3000 ugL-1) generó diferentes



anomalías corporales (lordosis, cifosis, malformación craneofacial, edema pericárdico, deformación de saco vitelino) en embriones de *Cyprinus carpio*, después de 6 días de exposición. Del mismo modo, en nuestro estudio, encontramos que los embriones de *Danio rerio* expuestos a CPX (20 – 40 ugL-1) presentaron diferentes malformaciones. Las más frecuentes fueron malformación craneofacial y la malformación del saco vitelino, mientras que las menos frecuentes fueron hipopigmentación, edema pericárdico y retraso del proceso de eclosión.

PCM y CPX se prescriben simultáneamente en la práctica terapéutica habitual, lo que genera una interacción farmacocinética entre ambos fármacos (Issa et al., 2007). Hasta ahora, no hay estudios que conozcamos que describan los efectos tóxicos de la mezcla PCM-CPX en embriones de *Danio rerio*. No obstante, estudios anteriores han establecido que CPX afecta la farmacocinética de PCM (Issa et al., 2006, 2007). En este trabajo de investigación, los embriones de *Danio rerio* fueron expuestos a mezclas PCM-CPX, a diferentes concentraciones (M1 – M4). Como ya hemos dicho, decidimos utilizar esta mezcla ya que estos fármacos se prescriben comunmente juntos (Issa et al., 2006). Además desde el punto de vista medioambiental, esto es importante ya que la presencia de fármacos en medios acuáticos no se manifiesta en un solo tipo, sino en un grupo muy extenso de moléculas diferentes que son biológicamente activas y que se mezclan en diferentes concentraciones (Graham et al., 2013; Muramatsu et al., 2016). Las mezclas PCM-CPX (M1 – M4) obtuvieron tasas de mortalidad del 34.7%, 51.4%, 61.1% y 75%, respectivamente. Como puede observarse, las tasas de mortalidad aumentan de forma dependiente de la concentración y del



tiempo; por lo tanto, podemos decir que la mezcla PCM-CPX es más embriotóxica que los fármacos administrados de forma individual (**Tabla 1**).

Las principales isoformas de CYP P450 responsables del metabolismo de la PCM son CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A4 (Nelson, 1995). Esto es importante, ya que el CPX es un potente inhibidor competitivo del CYP1A2 (Herrlin et al., 2000), por lo que podría causar un aumento de la concentración de PCM y NAPQI no metabolizados y, en consecuencia, inducir un aumento de las tasas de mortalidad y malformación (Dai & Cederbaum, 1995; Pasáre et al., 1979). En los seres humanos, se ha demostrado que el PCM y el CPX pueden atravesar la placenta y causar efectos mutagénicos cuando se administran en dosis elevadas (Black & Hill, 2003; Briggs et al., 2011). Además, también se ha informado de que el PCM es capaz de entrar en el corion en la fase previa a la eclosión embrionaria, y en consecuencia aumentar su potencial para producir malformaciones en los organismos (Kim et al., 2004). Aquí, demostramos que la mezcla PCM-CPX generó diferentes malformaciones en embriones de *Danio rerio*, siendo la malformación corporal la más común. La malformación corporal podría dar lugar a otras malformaciones (edema pericárdico, retraso en el proceso de eclosión y/o malformación de la cola, **Figura 4C**) ya que desde el inicio del desarrollo embrionario el funcionamiento de los órganos, sistemas y vías de biotransformación podría verse afectado por la interacción farmacocinética de PCM y CPX.

El estrés oxidativo es un proceso intracelular que se produce por un desequilibrio entre las enzimas antioxidantes y las especies oxidantes. Este proceso está estrechamente relacionado con el proceso de biotransformación de PCM y CPX. Así, una vez que el PCM es



biotransformado, se generan varias ROS, que son capaces de inducir daños en las biomoléculas (Gómez-Oliván et al., 2012). Del mismo modo, en el caso del CPX, se generan ROS en los microsomas hepáticos, tras el metabolismo de este fármaco (Wagai & Tawara, 1992; Gürbay et al., 2001). Esto es notable, ya que en nuestro estudio, observamos que el PCM (150-1200 ugL-1) y la CPX (10-40 ugL-1) por sí solos aumentaron la producción de malondiandehido (MDA) a las 72 hpf, mientras que la mezcla PCM-CPX aumentó la producción de MDA a las 96 hpf (**Figura 5A**).

Durante el desarrollo embrionario, la tasa relativa de oxígeno en el metabolismo fluctúa, provocando cambios en el estado redox de la célula (Hansen et al., 2017). Durante la organogénesis temprana, estos cambios podrían tener un efecto mucho más devastador en los embriones por dos razones. En primer lugar, porque las alteraciones del entorno reductor pueden provocar una disminución o el cese de la proliferación o promover la apoptosis (Timme-Laragy et al., 2017). En segundo lugar, porque las defensas antioxidantes durante la organogénesis temprana no están tan maduras como en etapas posteriores del desarrollo, y pueden permitir períodos más largos de desequilibrio oxidativo y alterar la señalización redox (Hansen et al., 2006).

Las enzimas antioxidantes son vitales para proteger a las células del daño causado por el estrés oxidativo. La CAT, por ejemplo, descompone el  $H_2O_2$  intramolecular en  $O_2$  y  $H_2O$ , mientras que la GPX cataliza la reducción de los peróxidos (hidroperóxidos y peróxidos lipídicos) en el alcohol. Un aumento en la actividad de la CAT puede ser el resultado de los altos niveles de  $H_2O_2$ , generados durante la biotransformación de la PCM (Bruno Nunes et



al., 2014; Ramos et al., 2014; Nogueira et al., 2019). Según nuestros resultados, el PCM (300-1200 ugL-1), CPX (10-40 ugL-1) y la mezcla PCM-CPX (M2-M4) aumentaron la actividad de la CAT en embriones de *Danio rerio* a las 72 y 96 hpf (**Figura 6B**). De manera similar, Zivna et al., (2016) revelaron que la CPX en concentraciones ambientalmente relevantes (1 ugL -1, 100 ugL-1, 500 ugL-1, 1000 ugL-1, 3000 ugL-1) indujo un aumento en la actividad de CAT y GPX en embriones de *Cyprinus carpio*.

Uno de los principales objetivos de las ROS en la oxidación reversible de las cisteínas, lo que conduce a la formación de enlaces disulfuro que modulan la conformación y la actividad de las proteínas. El principal producto de la actividad de NOX es el O<sub>2</sub>·, que es transformado inmediatamente y en gran medida en H<sub>2</sub>O por una enzima llamada superóxido dismutasa (SOD) (Bedard & Krause, 2007; Brandes et al., 2014). A lo largo de nuestro estudio, demostramos que la actividad de la SOD aumentó en embriones de *Danio rerio*, después de una exposición a PCM (300-1200 ugL-1), CPX (10-40 ugL-1) y la mezcla PCM-CPX (M2-M4) (**Figura 6A**). De acuerdo con nuestros resultados, Guiloski et al., (2017) y Gürbay et al., (2001). Encontraron que las enzimas antioxidantes, SOD y GPX, aumentaron su actividad en el pez macho *Rhamdia quelen* después de una exposición a PCM. En conjunto, estos resultados sugieren que tanto el PCM y CPX, así como su mezcla, aumentan la producción de ROS y la actividad de la enzima entioxidante SOD.

La oxidación del glutatión reducido a disulfuro de glutatión es catalizada por la GPX. El glutatión reducido es muy importante para el correcto progreso de las reacciones catalizadas por GPX y la glutatión S-transferasa (GST). La glutatión reductasa (GR) es una enzima que



promueve la conversión del disulfuro de glutatión en glutatión reducido (Di Giulio & Hinton, 2008). GST es un grupo de enzimas de biorransformación que catalizan la conjugación de xenobióticos y sustancias endógenas con el glutatión, durante las fases de biotransformación de la fase II. Además, estas enzimas también protegen a las células contra el daño del estrés oxidativo y los efectos tóxicos de una amplia gama de sustancias químicas (Chambers, 1987; Di Giulio & Hinton, 2008). Dado que encontramos una mayor actividad de GPX en todos los grupos de tratamiento (PCM, CPX y su mezcla), sugerimos que estos resultados se deben al colapso gradual de la vía enzimática GST. De acuerdo con nuestros resultados, Zivna et al., (2016) encontraron que concentraciones ambientalmente relevantes de CPX aumentaron la actividad de GPX en embriones de *Cyprinus carpio*. De manera similar, Nogueira et al., (2019) también reportaron que la exposición de embriones de *Danio rerio* a CPX, produjo un incremento importante en la actividad de GPX.

Nuestro análisis IBR demostró que PCM, CPX y su mezcla, pueden inducir un daño importante en los embriones de *Danio rerio*, como resultado de un aumento importante de los biomarcadores de daño oxidativo (LPX y HPX). Además, se confirma que a pesar de la actividad antioxidante de SOD, CAT, GPX, los biomarcadores de daño oxidativo siguen teniendo una importante influencia sobre los embriones. Esto puede explicarse debido a la mayor producción de ROS a través de la biotransformación de PCM y CPX.



## 12. CONCLUSIONES

Este estudio proporcionó información sobre los efectos embriotóxicos, teratogénicos y de estrés oxidativo de dos productos farmacéuticos PCM, CPX, así como sus mezclas PCM-CPX. El paracetamol, ciprofloxacina y sus mezclas indujeron diferentes alteraciones morfológicas en los embriones, afectando a la integridad de los organismos y, en consecuencia, provocando su muerte. Además, también demostramos que los efectos teratogénicos y embriotóxicos que ambos fármacos indujeron en los embriones de *D. rerio* han sido el resultado de la respuesta de estrés oxidativo generada por cada fármaco. Por lo tanto, se puede concluir que la presencia de estos fármacos puede ser perjudicial para las especies acuáticas. En general, nuestros resultados, contribuyen a comprender mejor los efectos tóxicos de los productos farmacéuticos, individualmente y en mezcla.

## 13. PERSPECTIVAS

Actualmente la contaminación ambiental por sustancias emergentes es un problema a nivel mundial, la contaminación de ambientes acuáticos es uno de los más afectados por estas sustancias, por ello es importante el estudio de los efectos nocivos que estos contaminantes pueden ocasionar sobre los diferentes organismos que en ellos habitan. Y de esta manera ampliar el conocimiento de los efectos que también pudieran ocasionar a los humanos.

La evidencia de los efectos nocivos por sustancias emergentes sobre las especies acuáticas va en crecimiento, esto podría ayudar a su futura regulación, desde el tratamiento de las aguas



residuales, municipales e industriales hasta su presencia en ambientes acuáticos naturales como ríos, lagos y mares.

Es por ello la importancia del desarrollo de investigaciones que traten acerca de los efectos toxicos, tal es el caso de esta investigación y de esta manera contribuir en el campo de exploración acerca de la toxicología ambiental.



#### 14. REFERENCIAS

- Adachi, F., Yamamoto, A., Takakura, K. I., & Kawahara, R. (2013). Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 444, 508–514. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.077>
- Armengol, M. (2018). *El pez cebrá como modelo de investigación biomédica*. June 2017.
- Arsand, J. B., Hoff, R. B., Jank, L., Bussamara, R., Dallegrave, A., Bento, F. M., Kmetzsch, L., Falção, D. A., do Carmo Ruaro Peralba, M., de Araujo Gomes, A., & Pizzolato, T. M. (2020). Presence of antibiotic resistance genes and its association with antibiotic occurrence in Dilúvio River in southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 738, 139781. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139781>
- Ávila, F., Luppi, M., Gaete, P., Rivas, A., Silva, F., & Olivares, R. (2019). Cambios en las prescripciones y el consumo de antimicrobianos, luego de la implementación de recomendaciones de uso: experiencia en un hospital universitario. *Revista Chilena de Infectología*, 36(3), 253–264. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000300253>
- Barceló, D., & López, M. J. (2008). *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. <http://elaguapotable.com/Contaminación y calidad quím del agua-los contaminantes emergentes.pdf>
- Becerra, M. ., & Albesa, I. (2002). Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297(4), 1003–1007. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02331-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02331-8)



- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. In *Physiological Reviews* (Vol. 87, Issue 1, pp. 245–313). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Black, R. A., & Hill, D. A. (2003). Over-the-Counter Medications in Pregnancy - American Family Physician. *American Family Physician*, 67(12), 2517–2524. <https://www.aafp.org/afp/2003/0615/p2517.html>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 72). [http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford\\_assay.pdf](http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf)
- Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 76, 208–226. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2014.07.046>
- Briggs, G. G., Freeman, R. K., & Yaffe, S. J. (2011). *Drugs in pregnancy and lactation : a reference guide to fetal and neonatal risk*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDermid, J. R., & Drapeau, P. (2003). Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *Journal of Physiology-Paris*, 97(1), 77–86. <https://doi.org/10.1016/J.JPHYSPARIS.2003.10.009>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(C), 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Calvo-Flores, F. G., Isac-García, J., & Dobado, J. A. (2017). Emerging Pollutants: Origin,



Structure and Properties. In *Emerging Pollutants: Origin, Structure and Properties*.

<https://doi.org/10.1002/9783527691203>

Cartagena, C. J. (2011). Emerging organic pollutants in environment: Pharmaceutical products. *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2), 143–153.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4315762>

Cedron, V. P., Weiner, A. M. J., Vera, M., & Sanchez, L. (2020). Acetaminophen affects the survivor, pigmentation and development of craniofacial structures in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biochemical Pharmacology*, 174, 113816.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113816>

Chambers, F. L. (1987). A textbook of modern toxicology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 8(10), 408. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(87\)90110-6](https://doi.org/10.1016/0165-6147(87)90110-6)

Choi, E., Alsop, D., & Wilson, J. Y. (2018). The effects of chronic acetaminophen exposure on the kidney, gill and liver in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 198, 20–29. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2018.02.007>

Dai, Y., & Cederbaum, A. I. (1995). Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P4502E1-transfected HepG2 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273(3).

David, A., & Pancharatna, K. (2009). Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Applied Toxicology*, 29(7), 597–602. <https://doi.org/10.1002/jat.1446>

Delhiraja, K., & Philip, L. (2020). Characterization of segregated greywater from Indian



households—part B: emerging contaminants. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192:432(7). <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08370-7>

Di Giulio, R. T. (Richard T., & Hinton, D. E. (2008). *The toxicology of fishes*. CRC Press.

Duan, L., Zhang, Y., Wang, B., Cagnetta, G., Deng, S., Huang, J., Wang, Y., & Yu, G. (2020). Characteristics of pharmaceutically active compounds in surface water in Beijing, China: Occurrence, spatial distribution and biennial variation from 2013 to 2017. *Environmental Pollution*, 264, 114753. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114753>

Dulio, V., Van Bavel, B., Brorström-Lundén, E., Harmsen, J., Hollender, J., Schlabach, M., Slobodnik, J., Thomas, K., & Koschorreck, J. (2018). Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations. *Environ Sci Eur*, 30, 5. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0135-3>

Ebert, I., Bachmann, J., Kühnen, U., Küster, A., Kussatz, C., Maletzki, D., & Schlüter, C. (2011). Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(12), 2786–2792. <https://doi.org/10.1002/etc.678>

Estrada-Arriaga, E. B., Cortés-Muñoz, J. E., González-Herrera, A., Calderón-Mólgora, C. G., de Lourdes Rivera-Huerta, M., Ramírez-Camperos, E., Montellano-Palacios, L., Gelover-Santiago, S. L., Pérez-Castrejón, S., Cardoso-Vigueros, L., Martín-Domínguez, A., & García-Sánchez, L. (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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.118>
- Fito-López, C., Palau, J., & Ballesteros, A. (2018). Predicted environmental concentration of engineering nanomaterials as emerging pollutants: baseline scenario. *Rev. Toxicol*, 84–88. <http://revista.aetox.es>
- Fraher, D., Sanigorski, A., Mellett, N. A., Meikle, P. J., Sinclair, A. J., & Gibert, Y. (2016). Zebrafish Embryonic Lipidomic Analysis Reveals that the Yolk Cell Is Metabolically Active in Processing Lipid. *Cell Reports*, 14(6), 1317–1329. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.01.016>
- Goel, P. K. (2006). *Water pollution : causes, effects and control*. New Age International.
- Gomes, M. P., Gonçalves, C. A., de Brito, J. C. M., Souza, A. M., da Silva Cruz, F. V., Bicalho, E. M., Figueredo, C. C., & Garcia, Q. S. (2017). Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.): Implications for energy metabolism and antibiotic-uptake ability. *Journal of Hazardous Materials*, 328, 140–149. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2017.01.005>
- Gómez-Oliván, L. M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Dublán-García, O., & Corral-Avitia, A. Y. (2012). Assessing the Oxidative Stress Induced by Paracetamol Spiked in Artificial Sediment on *Hyalella azteca*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(8), 5097–5104. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1261-y>
- Gómez, M. J., Petrović, M., Fernández-Alba, A. R., & Barceló, D. (2006a). Determination



of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters.

*Journal of Chromatography A*, 1114(2), 224–233.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.038>

Gómez, M. J., Petrović, M., Fernández-Alba, A. R., & Barceló, D. (2006b). Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters.

*Journal of Chromatography A*, 1114(2), 224–233.

<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2006.02.038>

Gonzales, J. M., & Law, S. H. W. (2013). Feed and Feeding Regime Affect Growth Rate and Gonadosomatic Index of Adult Zebrafish ( *Danio Rerio* ). *Zebrafish*, 10(4), 532–540.

<https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0891>

González Peña, O. I., López Zavala, M. Á., & Cabral Ruelas, H. (2021). Pharmaceuticals market, consumption trends and disease incidence are not driving the pharmaceutical research on water and wastewater. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 5, pp. 1–37). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052532>

Gothwal, R., & Shashidhar. (2017). Occurrence of high levels of fluoroquinolones in aquatic environment due to effluent discharges from bulk drug manufacturers. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*, 21(3), 05016003.

[https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)HZ.2153-5515.0000346](https://doi.org/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000346)



- Graham, G. G., Davies, M. J., Day, R. O., Mohamudally, A., & Scott, K. F. (2013). The modern pharmacology of paracetamol: Therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. In *Inflammopharmacology* (Vol. 21, Issue 3, pp. 201–232). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10787-013-0172-x>
- Greenham, R. T., Miller, K. Y., & Tong, A. (2019). Removal efficiencies of top-used pharmaceuticals at sewage treatment plants with various technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(5), 103294. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103294>
- Guerra, P., Kim, M., Shah, A., Alaei, M., & Smyth, S. A. (2014). Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*, 473–474, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.008>
- Guiloski, I. C., Ribas, J. L. C., Piancini, L. D. S., Dagostim, A. C., Cirio, S. M., Fávoro, L. F., Boschen, S. L., Cestari, M. M., da Cunha, C., & Silva de Assis, H. C. (2017). Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 53, 111–120. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2017.05.005>
- Günzler, W. A., & Flohé, L. (1985). Glutathione peroxidase. In *Handbook Methods for Oxygen Radical Research* (pp. 285–290). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351072922>
- Gürbay, A., Gonthier, B., Daveloose, D., Favier, A., & Hincal, F. (2001). Microsomal



- metabolism of ciprofloxacin generates free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(10), 1118–1121. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00508-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00508-1)
- Gutiérrez-Noya, V. M., Gómez-Oliván, L. M., Ramírez-Montero, M. del C., Islas-Flores, H., Galar-Martínez, M., & García-Medina, S. (2021). Survival and malformations rates, oxidative status in early life stages of *Cyprinus carpio* due to exposure to environmentally realistic concentrations of paracetamol. *Science of The Total Environment*, 768, 144585. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.144585>
- Halling-Sorensen, B., Lützhøft, H.-C. H., Andersen, H. R., & Ingerslev, F. (2000). Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(90001), 53–58. [https://doi.org/10.1093/jac/46.suppl\\_1.53](https://doi.org/10.1093/jac/46.suppl_1.53)
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., & Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11(7), 714–719. <https://doi.org/10.1021/es60130a004>
- Hanna, N., Sun, P., Sun, Q., Li, X., Yang, X., Ji, X., Zou, H., Ottoson, J., Nilsson, L. E., Berglund, B., Dyar, O. J., Tamhankar, A. J., & Stålsby Lundborg, C. (2018). Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk. *Environment International*, 114, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.003>
- Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T., & Widmer, R. M. (1998). Identification of



- fluoroquinolone antibiotics as the main source of *umuC* genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3), 377–382. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170305>
- He, J.-H., Guo, S.-Y., Zhu, F., Zhu, J.-J., Chen, Y.-X., Huang, C.-J., Gao, J.-M., Dong, Q.-X., Xuan, Y.-X., & Li, C.-Q. (2013). A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 67(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/J.VASCN.2012.10.003>
- Hermesen, S. A. B., van den Brandhof, E. J., van der Ven, L. T. M., & Piersma, A. H. (2011). Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicology in Vitro*, 25(3), 745–753. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.005>
- Hernández, F., Calisto-Ulloa, N., Gómez-Fuentes, C., Gómez, M., Ferrer, J., González-Rocha, G., Bello-Toledo, H., Botero-Coy, A. M., Boix, C., Ibáñez, M., & Montory, M. (2019). Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. *Journal of Hazardous Materials*, 363, 447–456. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.027>
- Herrlin, K., Segerdahl, M., Gustafsson, L. L., & Kalso, E. (2000). Methadone, ciprofloxacin, and adverse drug reactions. *Lancet*, 356(9247), 2069–2070. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03409-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03409-7)
- HydroSHEDS*. (n.d.). Retrieved May 20, 2021, from <https://hydrosheds.org/page/hydrorivers>
- Issa, M. M., Nejem, R. M., & El-Abadla, N. S. (2006). Oral ciprofloxacin affects the



pharmacokinetics of paracetamol in saliva. *Clinical Drug Investigation*, 26(4), 223–226.

<https://doi.org/10.2165/00044011-200626040-00007>

Issa, M. M., Nejem, R. M., El-Abadla, N. S., El-Naby, M. K., Roshdy, A. A., & Kheiralla, Z. A. (2007). Effects of paracetamol on the pharmacokinetics of ciprofloxacin in plasma using a microbiological assay. *Clinical Drug Investigation*, 27(7), 463–467.

<https://doi.org/10.2165/00044011-200727070-00003>

Janet Gil, M., María Soto, A., Iván Usma, J., & Darío Gutiérrez, O. (2012). *Emerging contaminants in waters: effects and possible treatments Contaminantes emergentes em águas, efeitos e possíveis tratamentos*. 7(2), 52–73.

<http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v7n2/v7n2a05.pdf>

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. *Analytical Biochemistry*, 202(2), 384–389. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N)

Kais, B., Schneider, K. E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C., & Braunbeck, T. (2013). Aquatic Toxicology. *Aquatic Toxicology*, 229–238.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.022>

Khatun, R. (2017). Water Pollution: Causes, Consequences, Prevention Method and Role of WBPHEd with Special Reference from Murshidabad District. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 7(8), 269–277. [www.ijsrp.org](http://www.ijsrp.org)

Kim, D. H., Sun, Y., Yun, S., Kim, B., Hwang, C. N., Lee, S. H., & Nelson, B. J. (2004).



- Mechanical property characterization of the zebrafish embryo chorion. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology - Proceedings*, 26 VII, 5061–5064. <https://doi.org/10.1109/iembs.2004.1404399>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Korwin-Kossakowski, M. (2012). Fish hatching strategies: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22(1), 225–240. <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9233-7>
- Lau, S. M., McGuire, T. M., & van Driel, M. L. (2016). Consumer concerns about paracetamol: a retrospective analysis of a medicines call centre. *BMJ Open*, 6(6), e010860. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010860>
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. (1994). [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 346–357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- Li, Y., Niu, X., Yao, C., Yang, W., & Lu, G. (2019a). Distribution, Removal, and Risk Assessment of Pharmaceuticals and Their Metabolites in Five Sewage Plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(23), 4729. <https://doi.org/10.3390/ijerph16234729>
- Li, Y., Niu, X., Yao, C., Yang, W., & Lu, G. (2019b). Distribution, Removal, and Risk Assessment of Pharmaceuticals and Their Metabolites in Five Sewage Plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(23), 4729.



<https://doi.org/10.3390/ijerph16234729>

- Liu, S., Ding, R., & Nie, X. (2019). Assessment of oxidative stress of paracetamol to *Daphnia magna* via determination of Nrf1 and genes related to antioxidant system. *Aquatic Toxicology*, 211, 73–80. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2019.03.014>
- Misra, H. P., & 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(10), 3170–3175. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9)
- Miyares, R. L., de Rezende, V. B., & Farber, S. A. (2014). Zebrafish yolk lipid processing: a tractable tool for the study of vertebrate lipid transport and metabolism. *Disease Models & Mechanisms*, 7(7), 915–927. <https://doi.org/10.1242/dmm.015800>
- Moriarty, C., & Carroll, W. (2016). Paracetamol: Pharmacology, prescribing and controversies. *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 101(6), 331–334. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-307287>
- Muramatsu, S., Shiraishi, S., Miyano, K., Sudo, Y., Toda, A., Mogi, M., Hara, M., Yokoyama, A., Kawasaki, Y., Taniguchi, M., & Uezono, Y. (2016). Metabolism of AM404 from acetaminophen at human therapeutic dosages in the rat brain. *Anesthesiology and Pain Medicine*, 6(1), e32873. <https://doi.org/10.5812/aapm.32873>
- Murray, K. E., Thomas, S. M., & Bodour, A. A. (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*, 158(12), 3462–3471. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2010.08.009>
- Nelson, S. D. (1995). Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites



that can cause acute liver injury. *Drug Metabolism Reviews*, 27(1–2), 147–177.  
<https://doi.org/10.3109/03602539509029821>

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. *Environmental Toxicology*, 34(11), 1177–1190. <https://doi.org/10.1002/tox.22819>

Nunes, B., Antunes, S. C., Santos, J., Martins, L., & Castro, B. B. (2014). Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 178–185.  
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2014.05.027>

Paches, M. (Universitat P. D. V. (2020). Contaminantes Emergentes. *Revista de Química Industrial*, 738, 4–13. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/142675/Pachés - Contaminantes emergentes.pdf?sequence=1>

Papageorgiou, M., Kosma, C., & Lambropoulou, D. (2016). Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Science of the Total Environment*, 543, 547–569. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.047>

Pasăre, G., Pasăre, V., Eftimescu, N., Ivan, M., & Milici, A. (1979). Combination of Antibiotics with Analgesic and Antipyretic Substances. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche*



*Abteilung: Mikrobiologie Der Landwirtschaft, Der Technologie Und Des Umweltschutzes*, 134(7), 640–647. [https://doi.org/10.1016/s0323-6056\(79\)80116-0](https://doi.org/10.1016/s0323-6056(79)80116-0)

Pérez-Alvarez, I., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Barceló, D., López De Alda, M., Pérez Solsona, S., Sánchez-Aceves, L., SanJuan-Reyes, N., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.116>

Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., & Freeman, B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028–22034. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54740-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54740-2)

Ramos, A. S., Correia, A. T., Antunes, S. C., Gonçalves, F., & Nunes, B. (2014). Effect of acetaminophen exposure in *Oncorhynchus mykiss* gills and liver: Detoxification mechanisms, oxidative defence system and peroxidative damage. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(3), 1221–1228. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2014.04.005>

Raymundo-Pereira, P. A., Gomes, N. O., Machado, S. A. S., & Oliveira, O. N. (2019). Simultaneous, ultrasensitive detection of hydroquinone, paracetamol and estradiol for quality control of tap water with a simple electrochemical method. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 848, 113319. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113319>

Richards, S. M., Wilson, C. J., Johnson, D. J., Castle, D. M., Lam, M., Mabury, S. A., Sibley,



- P. K., & Solomon, K. R. (2004). Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4), 1035–1042. <https://doi.org/10.1897/02-616>
- Sanchez, W., Burgeot, T., & Porcher, J.-M. (2013). A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
- Stephenson, M. (2000). Development and validation of the Stephenson Multigroup Acculturation Scale (SMAS). *Psychological Assessment*, 12(1), 77–88. <https://doi.org/10.1037/1040-3590.12.1.77>
- Tavares, B., & Lopes, S. S. (2013). The Importance of Zebrafish in Biomedical Research. *Acta Médica Portuguesa*, 26(5), 583–592. <https://doi.org/10.20344/AMP.4628>
- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., & Zhou, Z. (2019). *The use of zebrafish (Danio rerio) as biomedical models*. 9(3). <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- Tejada, C., Quiñonez, E., & Peña, M. (2014). Contaminantes Emergentes en Aguas: Metabolitos de Fármacos. Una Revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 80. <https://doi.org/10.18359/rfcb.341>
- Terera, S. R., & Ngirande, H. (2010). Mediterranean Journal of Social Sciences MJSS. In *Mediterranean Journal of Social Sciences* (Vol. 5, Issue 1). <https://www.mcser.org/journal/index.php/mjss/article/view/1760>
- Tran, N. H., Hoang, L., Nghiem, L. D., Nguyen, N. M. H., Ngo, H. H., Guo, W., Trinh, Q.



- T., Mai, N. H., Chen, H., Nguyen, D. D., Ta, T. T., & Gin, K. Y. H. (2019). Occurrence and risk assessment of multiple classes of antibiotics in urban canals and lakes in Hanoi, Vietnam. *Science of the Total Environment*, 692, 157–174. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.092>
- Veras, T. B., Luiz Ribeiro de Paiva, A., Duarte, M. M. M. B., Napoleão, D. C., & da Silva Pereira Cabral, J. J. (2019). Analysis of the presence of anti-inflammatory drugs in surface water: A case study in Beberibe river - PE, Brazil. *Chemosphere*, 222, 961–969. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.167>
- Wagai, N., & Tawara, K. (1992). Possible direct role of reactive oxygens in the cause of cutaneous phototoxicity induced by five quinolones in mice. *Archives of Toxicology*, 66(6), 392–397. <https://doi.org/10.1007/BF02035128>
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., & Costanzo, S. D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*, 407(8), 2711–2723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>
- Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., & Broschard, T. H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*, 281(1–3), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.004>
- Wolpert, L. (Lewis). (2011). *Principles of development*.
- Xia, L., Zheng, L., & Zhou, J. L. (2017). Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 182, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.054>



Xu, J. J., Hendriks, B. S., Zhao, J., & de Graaf, D. (2008). Multiple effects of acetaminophen and p38 inhibitors: Towards pathway toxicology. In *FEBS Letters* (Vol. 582, Issue 8, pp. 1276–1282). No longer published by Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.063>

Yi, K., Wang, D., QiYang, Li, X., Chen, H., Sun, J., An, H., Wang, L., Deng, Y., Liu, J., & Zeng, G. (2017). Effect of ciprofloxacin on biological nitrogen and phosphorus removal from wastewater. *Science of The Total Environment*, 605–606, 368–375.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.06.215>

Zivna, D., Plhalova, L., Chromcova, L., Blahova, J., Prokes, M., Skoric, M., Marsalek, P., Praskova, E., Stepanova, S., & Svobodova, Z. (2016). The effects of ciprofloxacin on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(7), 1733–1740. <https://doi.org/10.1002/etc.3317>

## 15. ANEXOS

Este trabajo doctoral generó los siguientes productos:



**15.1.** Estancia internacional en el Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA), Barcelona, España, donde se produjeron dos artículos de colaboración:

**15.1.1.** Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety.



Environment International

Volume 146, January 2021, 106253



## Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety

Melissa Faria <sup>a, 1</sup>, Juliette Bedrossiantz <sup>a, 1</sup>, Jonathan Ricardo Rosas Ramírez <sup>b</sup>, Marta Mayol <sup>c</sup>, Gerardo Heredia García <sup>b</sup>, Marina Bellot <sup>c</sup>, Eva Prats <sup>d</sup>, Natàlia Garcia-Reyero <sup>e</sup>, Cristian Gómez-Canela <sup>c</sup>, Leobardo Manuel Gómez-Oliván <sup>b</sup>, Demetrio Raldúa <sup>a</sup>  

<sup>a</sup> Institute for Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona, 18, 08034 Barcelona, Spain

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

<sup>c</sup> Department of Analytical Chemistry and Applied (Chromatography Section), School of Engineering, Institut Químic de Sarrià-Universitat Ramon Llull, Via Augusta 390, 08017 Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Research and Development Center (CID-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Environmental Laboratory, US Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS, USA

Received 12 August 2020, Revised 23 October 2020, Accepted 27 October 2020, Available online 18 November 2020.

Handling editor: Marti Nadal



**15.1.2.** Androgenic activation, impairment of the monoaminergic system and altered behavior in zebrafish larvae exposed to environmental concentrations of fenitrothion.



Science of The Total Environment

Volume 775, 25 June 2021, 145671



# Androgenic activation, impairment of the monoaminergic system and altered behavior in zebrafish larvae exposed to environmental concentrations of fenitrothion

Melissa Faria <sup>a</sup>, Eva Prats <sup>b</sup>, Jonathan Ricardo Rosas Ramírez <sup>c</sup>, Marina Bellot <sup>d</sup>, Juliette Bedrossiantz <sup>a</sup>, Maria Pagano <sup>e</sup>, Arnau Valls <sup>f</sup>, Cristian Gomez-Canela <sup>d</sup>, Josep M. Porta <sup>f</sup>, Jordi Mestres <sup>g</sup>, Natalia Garcia-Reyero <sup>h</sup>, Caterina Faggio <sup>e</sup>, Leobardo Manuel Gómez Oliván <sup>c</sup>, Demetrio Raldua <sup>a</sup> ✉

- <sup>a</sup> Institute for Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona, 18, 08034 Barcelona, Spain
- <sup>b</sup> Research and Development Center (CID-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain
- <sup>c</sup> Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tolloca s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, Mexico
- <sup>d</sup> Department of Analytical Chemistry and Applied (Chromatography section), School of Engineering, Institut Químic de Sarrià-Universitat Ramon Llull, Via Augusta 390, 08017 Barcelona, Spain
- <sup>e</sup> Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale Ferdinando Stagno d'Alcontres, 31, 98166 Agata-Messina, Italy
- <sup>f</sup> Institut de Robòtica i Informàtica Industrial, CSIC-UPC, Barcelona, Spain
- <sup>g</sup> Systems Pharmacology, Research Group on Biomedical Informatics (GRIB), IMIM Hospital del Mar Medical Research Institute and Universitat Pompeu Fabra, Parc de Recerca Biomèdica, Chemotargets SL, Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain
- <sup>h</sup> Environmental Laboratory, US Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS, USA

Received 15 December 2020, Revised 11 January 2021, Accepted 1 February 2021, Available online 15 February 2021.

Editor: Daniel Wunderlin



## 15.2. Artículo producto de esta investigación:



### Science of The Total Environment

Volume 806, Part 2, 1 February 2022, 150541



# Teratogenic effects induced by paracetamol, ciprofloxacin, and their mixture on *Danio rerio* embryos: Oxidative stress implications

Jonathan Ricardo Rosas-Ramírez <sup>a, 1</sup>, José Manuel Orozco-Hernández <sup>a, 1</sup>, Gustavo Axel Elizalde-Velázquez <sup>a</sup>, Demetrio Raldúa <sup>b</sup>, Hariz Islas-Flores <sup>a</sup>, Leobardo Manuel Gómez-Oliván <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón Intersección Paseo Toluca s/n, Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, Mexico

<sup>b</sup> Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

Received 20 July 2021, Revised 26 August 2021, Accepted 19 September 2021, Available online 25 September 2021.

Editor: Henner Hollert