



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Química



Evaluación del estrés oxidativo y expresión
génica inducidos por un efluente
hospitalario de la ciudad de Puebla sobre
Danio rerio

Tesis que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias Químicas

Presenta:

Biól. Amb. Francisco Javier Ramírez Moreno

Comité tutorial:

Tutor Académico, Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Tutor adjunto, Dra. Hariz Islas Flores

Tutor externo, Dra. Sandra Medina García

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
PROMOCIÓN 2021B

CONTENIDO

índice de tablas	4
índice de figuras	5
1.2 Abstract.....	8
2. Introducción.....	9
3. Marco teórico	13
3.1 Contaminación del agua	13
3.1.1 Contaminantes emergentes.....	13
3.2 Efluentes hospitalarios	14
3.3 Toxicología ambiental	15
3.4 Toxicogenómica.....	15
3.5 Bioensayos para evaluar toxicidad	16
3.6 Bioindicadores	16
3.6.1 Características de un bioindicador.....	17
2.7 <i>Danio rerio</i>	17
3.8 Biomarcador	18
3.9 Estrés oxidativo	20
3.9.1 Sistemas antioxidantes	21
3.9.2 Mecanismos de oxidación celular.....	24
3.10 Apoptosis	27
3.11 Expresión génica	31
3.11.1 Fundamentos de PCR	32
3.12 RT-qPCR	34
3.12.1 Cinética de la PCR en tiempo real.....	35
3.12.2 Técnicas de cuantificación	38

3.13 Secuenciación	40
3.13.1 Illumina	40
3.13.2 PacBio	40
3.13.3 Ion Torrent	41
3.14 Metataxonómica y Metagenómica	42
3.14.1 Secuenciación de amplicones	42
3.14.2 Secuenciación de shotgun	42
3.14.3. Herramientas bioinformáticas para análisis metataxonómicos	43
4. Antecedentes	44
4.2 Justificación	48
4.3 Pregunta de investigación	50
4.4 Hipótesis	50
4.5 Objetivo general	50
4.5.1 Objetivos específicos	50
5. Marco metodológico	51
5.1 Sitio de muestreo y recolección del EH	51
5.3 Mantenimiento de organismos prueba (<i>Danio rerio</i>)	53
5.4 Diseño experimental para evaluar el estrés oxidativo	53
5.4.1 Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo	54
5.4.2 Determinación de la lipoperoxidación	54
5.4.3 Determinación del contenido de carbonilo proteico	55
5.4.4 Evaluación del contenido de hidroperóxido	55
5.4.5 Determinación de la actividad superóxido dismutasa	56
5.4.6 Determinación de la actividad catalasa	56
5.4.7 Determinación del contenido de proteína total	56

5.5	Diseño experimental para evaluar la expresión génica	57
5.6	Análisis metataxonómico del EH	59
5.6.1	Extracción del ADN metagenómico	59
5.6.2	Análisis de las secuencias.	59
5.7	Ubicación filogenética de secuencias aminoacídicas SOD y CAT	60
5.8	Análisis estadísticos	62
6.	Resultados	63
6.1	Caracterización fisicoquímica del EH	63
6.2	Caracterización de contaminantes del EH	64
6.3	Caracterización metataxonómica del EH	65
6.4	Biomarcadores de estrés oxidativo en hígado, intestino, cerebro y branquias	68
6.5	Expresión génica en hígado, intestino, cerebro y branquias	73
6.6	Ubicación filogenética SOD y CAT	74
7.	Discusión	76
8.	Conclusiones	85
9.	Referencias	86

índice de tablas

Tabla 1. Interacciones sinérgicas, antagónicas y aditivas reportadas en diferentes especies bioindicadoras.	14
Tabla 2. Efectos adversos ocasionados por EH a diferentes concentraciones.	47
Tabla 3. Métodos utilizados para la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo.	54
Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos.....	59
Tabla 5. Especies empleadas para elaboración de árbol filogenético.	61
Tabla 6. Caracterización físico-química del efluente hospitalario de la Ciudad de Puebla. N.E, No establecida en la norma.	63
Tabla 7. Contaminantes detectados en el efluente hospitalario de la Ciudad de Puebla. Se muestran con * los datos que superan los valores establecidos por la normatividad mexicana.	64
Tabla 8. índices de diversidad bacteriana de las muestras HB1 y HB2 procedentes del EH.....	65

índice de figuras

Figura 1. Ocurrencia de contaminantes en efluentes hospitalarios. ^a (Gómez-Oliván <i>et al.</i> , 2019), ^b (Deguenon <i>et al.</i> , 2022), ^c (Niemi <i>et al.</i> , 2020), ^d (Rosales-Pérez <i>et al.</i> , 2022), ^e (Ajibola <i>et al.</i> , 2021), ^f (Oliveira <i>et al.</i> , 2015), ^g (Jha <i>et al.</i> , 2017).	12
Figura 2. Reacción global de la lipoperoxidación.....	25
Figura 3. Culminación LPX.....	26
Figura 4. Mecanismo de apoptosis. Tomado de Goodman, 1996.	31
Figura 5. Cinética de amplificación de la PCR. Fuente: Elaboración propia (2022).	34
Figura 6. Cinética de amplificación de la q-RT-PCR. Este gráfico muestra las cuatro fases de la cinética de amplificación. Fuente: Elaboración propia (2022). .	36
Figura 7. Método no específico. SYBR Green unido al ADN de doble cadena. Fuente: Elaboración propia (2022)......	38
Figura 8. Localización del Hospital Beneficencia Española de la Ciudad de Puebla, México.	51
Figura 9. Esquema metodológico.....	52
Figura 11. Caracterización metataxonómica de la muestra HB1 procedente del EH.	67
Figura 12. Caracterización metataxonómica de la muestra HB2 procedente del EH.	67
Figura 13. Lipoperoxidación (LPX) en Hígado A, Intestino B, Cerebro C, Branquias D en <i>D. rerio</i> expuesto a 4 proporciones de un EH por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la mediana ± Rango intercuartílico, n= 9. * Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). N= 378 peces.	70
Figura 14. Contenido de Hidroperóxidos (HPC) en Hígado A, Intestino B, Cerebro C, Branquias D en <i>D. rerio</i> expuesto a 4 proporciones de un EH por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la mediana ± Rango intercuartílico, n= 9. *	

Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). N= 378 peces.....	70
Figura 15 Contenido de proteínas carboniladas (PCC) en Hígado A, Intestino B, Cerebro C, Branquias D en <i>D. rerio</i> expuesto a 4 proporciones de un EH por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la mediana \pm Rango intercuartílico, n= 9. * Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). N= 378 peces.....	71
Figura 16. Actividad Superóxido dismutasa (SOD) en Hígado A, Intestino B, Cerebro C, Branquias D en <i>D. rerio</i> expuesto a 4 proporciones de un EH por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la mediana \pm Rango intercuartílico, n= 9. * Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). N= 378 peces.....	72
Figura 17. Actividad Catalasa (CAT) en Hígado A, Intestino B, Cerebro C, Branquias D en <i>D. rerio</i> expuesto a 4 proporciones de un EH por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la mediana \pm Rango intercuartílico, n= 9. * Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). N= 378 peces.....	73
Figura 18. Mapa de calor para evaluar las variaciones en los niveles de expresión de transcritos de 7 genes después de la exposición a 4 proporciones de un efluente hospitalario a 96 h en hígado, intestino, cerebro y branquias en adultos de <i>D. rerio</i> . Los valores son el promedio \pm DS, n= 3. Se empleo una ANOVA-1 Fisher y SNK ($p < 0.05$). N= 90 peces.	74
Figura 19. Se muestra el árbol filogenético inferido utilizando neighbor joining, el método de Máxima Verosimilitud y el modelo basado en matriz JTT. Este análisis involucró 12 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 977 posiciones en el conjunto de datos final. Los números representan los valores Bootstrap.....	75
Figura 20. Mecanismo toxicodinámico propuesto a través del cual un efluente hospitalario induce daño en <i>D. rerio</i>	84

1. Resumen

Los efluentes hospitalarios (EHs) representan una amenaza para el medio ambiente debido al contenido de sustancias tóxicas capaces de alterar la estructura y función de los ecosistemas. Aunque existe información relevante del impacto de los EHs sobre organismos acuáticos, el mecanismo molecular que subyace a dicho proceso ha recibido poca o nula atención. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el estrés oxidativo y expresión génica inducido por diferentes proporciones (2 %, 2.5 %, 3 % y 3.5 %) de un efluente hospitalario (EH) en hígado, intestino, cerebro y branquias de *Danio rerio* a diferentes tiempos de exposición. Se observaron incrementos significativos en los niveles de lipoperoxidación (LPX), proteínas carboniladas (PCC), hidroperóxidos (HPC), así como en la actividad Superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) en la mayoría de los órganos evaluados en las 4 proporciones probadas con respecto al grupo control ($p < 0.05$). Se encontró que a mayores tiempos de exposición hay menor respuesta en la actividad SOD, lo cual sugiere un agotamiento catalítico debido al ambiente oxidativo a nivel intracelular. La falta de complementariedad entre los patrones de la actividad SOD y RNAm apuntan a que la actividad *per se* está subordinada a procesos post-transcripcionales. Se observó una regulación al alza de los transcritos relacionados con procesos antioxidantes (*nrf2*, *cat*, *sod*), desintoxicación (*cyp1a1*) y apoptosis (*casp9*, *bax*, y *casp6*) en respuesta al desbalance oxidativo. Por otro lado, el enfoque metataxonómico permitió caracterizar géneros bacterianos patógenos como *Mycobacterium*, *Clostridium XI*, *Pseudomonas*, *Legionella* and *Parachlamydia* en el EH. Se concluye que la exposición del EH sobre *D. rerio* causa estrés oxidativo y altera la expresión génica, incrementando el daño cuando la respuesta antioxidante disminuye.

Palabras clave: Estrés oxidativo, Expresión génica, Apoptosis, Efluente hospitalario, Metataxonómico, *Danio rerio*

1.2 Abstract

Hospital effluents (HEs) pose a risk to the environment due to their toxic substance content capable of altering the function and structure of ecosystems. Although there is relevant information on the impact of HEs on aquatic organisms, the molecular mechanism underlying this process has received scarce attention. The current investigation intended to assess the oxidative stress and gene expression caused by different proportions (2 %, 2.5 %, 3 %, and 3.5 %) of a hospital effluent (HE) in liver, intestine, brain, and gills of *Danio rerio* at different exposure times. Meaningful rise in the levels of lipoperoxidation (LPX), carbonyl proteins (PCC), hydroperoxides (HPC), as well as Superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) activity were observed in most of the organs evaluated in the 4 proportions tested with respect to the control group ($p < 0.05$). It was found that after long-term exposure there is a lower response in SOD activity, suggesting catalytic depletion owing to the oxidative environment at the intracellular level. The absence of complementarity among SOD and mRNA activity patterns suggests that the activity *per se* is subordinated to post-transcriptional processes. Up-regulation of transcripts related to antioxidant processes (*nrf2*, *cat*, *sod*), detoxification (*cyp1a1*) and apoptosis (*casp9*, *bax*, and *casp6*) was observed in response to oxidative unbalance. Alternatively, the metataxonomic approach permitted the characterization of pathogenic bacterial genera namely *Mycobacterium*, *Clostridium XI*, *Pseudomonas*, *Legionella* and *Parachlamydia* present in HE. It is concluded that HE exposure on *D. rerio* causes oxidative stress and alters gene expression, increasing damage when the antioxidant response decreases.

Keywords: Oxidative stress, Gene expression, Apoptosis, Hospital effluent, Metataxonomic, *Danio rerio*

2. Introducción

Recientemente, la contaminación hídrica se ha vuelto un problema apremiante debido a la importancia del agua como recurso elemental para el funcionamiento fisiológico de los organismos vivos, así como para satisfacer bienes y servicios productivos del ser humano. Esta es resultado del apresurado crecimiento económico global y el empleo inapropiado del agua como fuente directa de eliminación de desechos (Verlicchi, 2021). Según estimaciones de la UNESCO (2017), las aguas de desecho proceden en gran medida de efluentes industriales, municipales, agrícolas y hospitalarios, los cuales se incorporan a los ecosistemas sin un tratamiento previo a su disposición final.

En particular, los hospitales según su ubicación, tiempo de funcionamiento, tamaño y diversidad de servicios pueden generar una cantidad considerable de aguas residuales (400 a 1200 L/cama/día), dando lugar a la eliminación constante de xenobióticos provenientes de análisis clínicos, diagnósticos, limpieza y excreción de compuestos farmacéuticos por parte de los pacientes (Kumari *et al.*, 2020). Estos compuestos al interactuar sinérgica y aditivamente pueden generar efectos nocivos como toxicidad, mutagenicidad y genotoxicidad volviendo hasta 15 veces más tóxica el agua residual de hospitales en contraste con efluentes domésticos (Olvera-Néstor *et al.*, 2016).

Debido a la carente legislación respecto a descargas hospitalarias en México, existe incertidumbre en cuanto a los posibles daños toxicológicos que podrían generar sobre la biota, estructura y función del medio ambiente. Los efluentes hospitalarios (EHs) en México pueden contener concentraciones de fármacos que fluctúan desde el orden de ng/L a µg/L. Los contaminantes reportados con mayor frecuencia (Figura 1) son los metales pesados, antiinflamatorios no esteroideos (AINES), glucocorticoides, inhibidores de la bomba de protones, antagonistas de la histamina entre otros (Rosales-Pérez *et al.*, 2022; Luján-Mondragón *et al.*, 2019). Aunado a ello la presencia de metales pesados, metabolitos secundarios de los fármacos y la presencia de bacterias resistentes a antibióticos explica en parte la toxicidad asociada a los EHs (Cuetero-Martínez *et al.*, 2023).

Los elementos presentes en los EHs sufren diversas formas de degradación cuando se liberan en aguas superficiales, incluida la degradación biótica (metabólica) y abiótica (oxidación, hidrólisis, fotólisis), posibilitando la producción de metabolitos más tóxicos que las moléculas originales (Li y Lin, 2015; Baillie y Rettie, 2011). Por otro lado, aquellos compuestos que no sufren alguna clase de transformación dentro de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) o en el ecosistema, en muchas ocasiones y en función de sus características fisicoquímicas (p. ej. coeficiente de reparto, factor de bioconcentración, presión de vapor etc.) poseen la capacidad de acumularse en distintos compartimentos ambientales, intensificando su biodisponibilidad y bioacumulación (Świacka *et al.*, 2022; Ahmad *et al.*, 2021).

El estrés oxidativo es un desafío común para los organismos acuáticos frente a la exposición a diversos contaminantes ambientales. Ocurre por el aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la disminución de la capacidad de un sistema biológico para neutralizarlas, ya que debido a su naturaleza reactiva, las EROs son muy inestables y potencialmente tóxicas (Sies *et al.*, 2017; Halliwell y Gutteridge, 2015). El metabolismo de los compuestos presentes en los EHs genera un exceso de EROs (Seoane *et al.*, 2017). De tal forma que la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) son la primera línea de defensa antioxidante (Ighodaro y Akinloye, 2018). Cuando la capacidad antioxidante de la biota expuesta a xenobióticos se ve superada, las moléculas oxidantes (O_2^- , H_2O_2 , radicales OH^\bullet etc.,) tienen la capacidad de interactuar con proteínas y lípidos de membrana, dando como resultado procesos de Carbonilación proteica (PCC), Lipoperoxidación (LPX) y generación de Hidroperóxidos (HPC) (Kancheva y Angelova, 2017; Levine *et al.*, 1994). Se ha demostrado que bajo condiciones de estrés oxidativo la proteína Nrf-2 puede translocarse desde el citosol hacia el núcleo y dimerizarse con proteínas pequeñas Maf y transactivar el elemento de respuesta antioxidante (ARE), el cual es una secuencia potenciadora localizada en la región promotora de varios genes implicados en la transducción de enzimas antioxidantes (Bhakkialakshmi *et al.*, 2018). Por otro lado, existen genes (*casp6*, *bax*, *casp9* y *cyp1a1*) relacionados con

procesos apoptóticos y metabolismo de xenobióticos que pueden brindar información valiosa para dilucidar el mecanismo toxicodinámico mediante el cual los EHs generan daños oxidativos en organismos no objetivo (Buttke y Sandstrom, 1994).

De la gran diversidad de microorganismos que habitan la biósfera, solo una pequeña parte es cultivable, ante dicha dificultad se han desarrollado nuevas estrategias que permiten su estudio (Ranjan *et al.*, 2016). La ecología microbiana evalúa la diversidad, abundancia y distribución de los microorganismos a diferentes niveles de organización biológica, con la finalidad de entender sus relaciones con el entorno. Para llevar a cabo dichas evaluaciones es necesario la extracción del material genómico o metagenómico de una muestra ambiental. La metagenómica emplea dos enfoques, la secuenciación de amplicones y shotgun. La primera involucra el análisis metataxonómico que se basa en la amplificación y secuenciación de marcadores genéticos como el 16S ARNr, 18S ARNr o la región espaciadora interna (ITS) en plataformas de secuenciación de alto rendimiento, cuyo objetivo principal es caracterizar de manera específica las comunidades bacterianas y su diversidad (Cuetero-Martínez *et al.*, 2023). Mientras que el enfoque shotgun es mayormente utilizado para identificar el potencial metabólico (genes) de los integrantes de la comunidad bacteriana (metagenómica funcional) (Ranjan *et al.*, 2016).

En la actualidad el número de investigaciones respecto a los posibles daños toxicológicos de los EHs son hasta la fecha aún incipientes, aunque se sabe que los EHs pueden generar efectos adversos, el mecanismo molecular que subyace a dicho proceso ha recibido poca o ninguna atención (Rosales-Pérez *et al.*, 2022; Neri-Cruz *et al.*, 2015). Aunado al escaso uso de enfoques metataxonómicos que permiten caracterizar factores biológicos (bacterias) que podrían repercutir en los organismos vivos expuestos a EHs. Por lo anterior, la presente investigación adopta criterios de evaluación toxicológica desde un nivel bioquímico, determinando biomarcadores de oxidación celular y antioxidación (PCC, LPX, HPC, SOD y CAT), al mismo tiempo que se revisa a un nivel molecular,

examinando la expresión relativa de genes objetivo (*sod*, *cat*, *nrf2*, *bax*, *casp6*, *cyp1a1* y *casp9*). En este sentido, se analizaron órganos diana (hígado, intestino, cerebro y branquias) de *Danio rerio* expuestos (12 h - 96 h) a cuatro proporciones (2 %, 2.5 % , 3 % y 3.5 %) de un efluente hospitalario (EH) proveniente de la Ciudad de Puebla. Finalmente, se caracterizó las comunidades bacterianas del EH mediante un enfoque metataxonómico, con la finalidad de resaltar la presencia de bacterias oportunistas que también representa un peligro inminente hacia la salud de los organismos vivos.

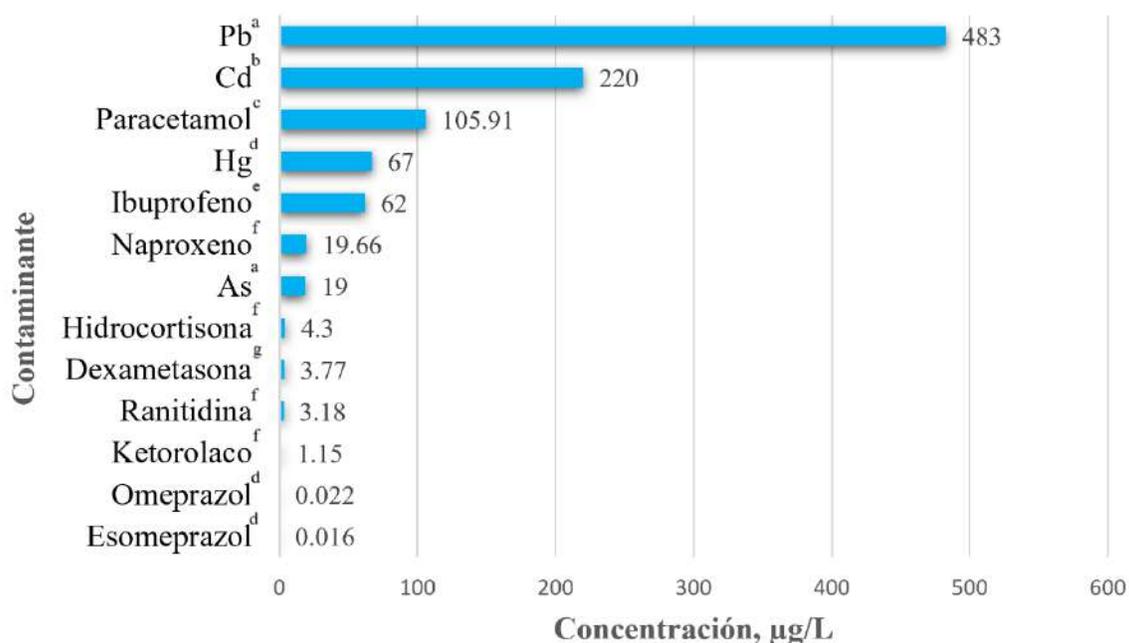


Figura 1. Ocurrencia de contaminantes en efluentes hospitalarios. ^a (Gómez-Oliván *et al.*, 2019), ^b (Deguenon *et al.*, 2022), ^c (Niemi *et al.*, 2020), ^d (Rosales-Pérez *et al.*, 2022), ^e (Ajibola *et al.*, 2021), ^f (Oliveira *et al.*, 2015), ^g (Jha *et al.*, 2017).

3. Marco teórico

3.1 Contaminación del agua

Se define como la incorporación de agentes externos al medio acuático alterando su calidad y limitando su uso. Hoy día la contaminación hídrica es un problema alrededor del mundo, se estima que aproximadamente 14000 personas mueren cada día debido a esta situación, por ello es preciso una evaluación continua de la política de recursos hídricos para contrarrestar este problema (OMS, 2005).

La calidad del agua está influenciada por múltiples factores, tal es el caso de la precipitación, el clima, el uso de suelo, la geología, vegetación, las condiciones de flujo, el agua subterránea y las actividades humanas. Sin embargo, la mayor amenaza para la calidad del agua la representan las fuentes puntuales de contaminación, como lo son las industrias farmacéuticas, textiles o los hospitales (Guadarrama-Tejas *et al.*, 2016).

Los contaminantes incluyen compuestos orgánicos e inorgánicos, como detergentes, pesticidas, metales pesados, hidrocarburos, gases y contaminantes emergentes como compuestos farmacéuticos, productos de cuidado personal, microplásticos, entre otros (Chaudhry y Malik, 2017).

3.1.1 Contaminantes emergentes

Se refiere aquellos compuestos principalmente químicos, poco estudiados y de los que se desconoce sobre su efecto y ocurrencia en el medio ambiente, por ende, se carece de legislación al respecto. Dado que su estudio es reciente, son escasos los procedimientos particulares para su determinación en los diferentes compartimentos ambientales. Además de que su presencia en el medio ambiente puede ser a concentraciones traza.

Estos compuestos no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos. En este sentido, los efectos nocivos derivan producto de su continua introducción al medio ambiente (Villaseñor-Basulto *et al.*, 2015). Algunos ejemplos son fármacos como, paracetamol, ácido salicílico y diclofenaco, así como sus

respectivos metabolitos secundarios como NAPQI, ácido acetilsalicílico, 2,6 dicloroanilina. Así mismo, existe evidencia que respalda las interacciones que pueden ocurrir en mezclas complejas de contaminantes emergentes, lo cual evidentemente repercute en la salud de los ecosistemas acuáticos (Tabla 1).

Tabla 1. Interacciones sinérgicas, antagónicas y aditivas reportadas en diferentes especies bioindicadoras.

Efecto	Compuesto	Concentración mg/L	Especie	Referencia
Sinérgico	Ibuprofeno diclofenaco	17.56 ± 0.02 7.1 ± 0.05	<i>Cyprinus carpio</i>	(Islas-Flores <i>et al.</i> , 2017)
Sinérgico	Dexametasona Diclofenaco	49.61 9.7	<i>Vibrio fischeri</i>	(Ukić <i>et al.</i> , 2019)
Sinérgico	Cd (II) Cu (II)	0.022481 0.006345	<i>Danio rerio</i>	(Pilehvar <i>et al.</i> , 2020)
Sinérgico	Metformina Ranitidina	13.8 239.7	<i>Daphnia similis</i>	(Godoy <i>et al.</i> , 2019)
Antagónico	Arsénico Fluoruros	0.03787 6.8	<i>Danio rerio</i>	(Mondal <i>et al.</i> , 2019)
Antagónico	Eritromicina Diclofenaco	136.88 9.7	<i>Vibrio fischeri</i>	(Ukić <i>et al.</i> , 2019)
Aditivo	Cortisol Clobetasol	0.05183 0.05706	Embriones <i>Danio rerio</i>	(Willi <i>et al.</i> , 2018)
Aditivo	Diclofenaco Carbamazepina	9.7 52.2	<i>Vibrio fischeri</i>	(Ukić <i>et al.</i> , 2019)

3.2 Efluentes hospitalarios

En los últimos años, la presencia de compuestos farmacéuticos en las aguas residuales es preocupante, ya que afecta el medio ambiente y la salud humana (Oliveira *et al.*, 2018; Verlicchi *et al.*, 2012).

En México, los sistemas de tratamiento de aguas residuales han sido diseñados con el propósito de purificar sólidos, materia orgánica disuelta y nutrientes. Sin embargo, muchos compuestos tóxicos pasan por el proceso de tratamiento con escasas modificaciones en su concentración (Castro-Pastrana *et al.*, 2015). Además, para lograr un buen tratamiento del agua hospitalaria, se requiere un conocimiento previo del efluente, por ejemplo, es necesario tener conocimiento del número de camas hospitalarias, el número de habitantes en el área de hospitalización, el volumen de aguas residuales por día por cama, el volumen de

aguas residuales por día por habitante y finalmente el flujo de agua del cuerpo receptor (Verlicchi *et al.*, 2012).

Diversas investigaciones evidencian que los contaminantes emergentes no son degradados eficientemente cuando se someten a tratamientos tradicionales. (Frédéric y Yves, 2014; Gabet-Giraud *et al.*, 2010). Por lo tanto, los xenobióticos pueden detectarse en fuentes de agua potable, alcantarillado municipal o en el medio acuático.

3.3 Toxicología ambiental

Según información publicada por Chemical Abstract Service se estima que, de aproximadamente 54 millones de sustancias químicas disponibles comercialmente, apenas 283 000 se encuentran inventariadas o reguladas. Dichas sustancias, al ser eventualmente liberadas al ambiente sufren diversas transformaciones e interacciones complejas que incrementan aún más su número (Sisinno y Oliveira-Filho, 2021).

Con el objetivo de evitar o minimizar las consecuencias de uso y liberación de sustancias químicas, en 1962 Rachel Carson abrió las puertas a una nueva disciplina, denominada toxicología ambiental. Esta disciplina habitualmente se encarga del estudio de los posibles efectos adversos en un organismo modelo que generalmente ocurren tras la exposición aguda o crónica a diferentes concentraciones ambientalmente relevantes de un xenobiótico en cuestión a partir de valoraciones a nivel morfológico (p. ej. embriotoxicidad), fisiológico (p. ej. respuesta antioxidante) o citológico (p. ej. actividad caspasa ó ensayo TUNEL).

3.4 Toxicogenómica

En la actualidad los avances tecnológicos sobre todo en las conocidas ciencias ómicas han contribuido a la diversificación y surgimiento de diversas disciplinas, tal es el caso de la toxicogenómica, la cual se encarga de analizar la respuesta genómica de bioindicadores sometidos a agentes físicos, químicos y biológicos. En este sentido, es indispensable la implementación de metodologías (PCR, qRT-PCR, secuenciación metagenómica shotgun) e información de las ciencias ómicas

(genómica, transcriptómica, metagenómica etc.) para lograr ahondar en el entendimiento de mecanismos biológicos de respuesta frente a diferentes contaminantes potencialmente tóxicos para los individuos (García-Calvo, 2019). Por tanto, es posible estudiar la dinámica de interacción que puede llevarse a cabo entre los diferentes genes y el estímulo ambiental (concentraciones ambientalmente relevantes de xenobióticos) en el desarrollo de estados perjudiciales para los organismos experimentales (Lara-Flores y Osten, 2011).

3.5 Bioensayos para evaluar toxicidad

Se trata de ensayos que se llevan a cabo en laboratorio para evaluar el efecto adverso de compuestos químicos, físicos o biológicos sobre organismos vivos a partir de la medición de la exposición a las sustancias y la respuesta al daño en el organismo en estudio. Cabe señalar que este tipo de ensayos generalmente se desarrollan a nivel celular y molecular partiendo de hipótesis de cómo cambios en el funcionamiento celular podrían afectar la capacidad general de los individuos (Carriquiriborde, 2021).

Los bioensayos de toxicidad en su mayoría han sido diseñados para un grupo reducido de individuos de una misma especie, de modo que existe poca información referente al efecto tóxico que ejercen las sustancias a nivel estructural y funcional de diversos ecosistemas, en particular sobre ecosistemas acuáticos. Dado que es más fácil realizar bioensayos de toxicidad monoespecíficas en organismos acuáticos, se han estandarizado pruebas para organismos que incluyen, algas, peces, plantas vasculares e incluso invertebrados como crustáceos e insectos en estadios larvarios. Dentro de los peces se ha utilizado ampliamente al pez cebra (*Danio rerio*) como especie bioindicadora de respuesta (Rice *et al.*, 2012; ASTM, 1994).

3.6 Bioindicadores

Se le llama bioindicador a aquella especie o población con requerimientos ambientales (variables bioclimáticas, físicas y químicas) particulares, que cuando enfrentan una alteración ecológica ésta es capaz de provocar cambios en su

distribución, abundancia, morfología o incluso en su fisiología, de modo que los organismos bioindicadores proveen información respecto al impacto de contaminantes en el ecosistema en cuestión y el riesgo que representa a diversos organismos, otros ecosistemas e incluso al ser humano. Por consiguiente, los bioindicadores hacen posible no solo la evaluación de las consecuencias de las perturbaciones antrópicas, sino que permite también predecir los daños antes de que estos ocurran (Romano, 2016; Anze *et al.*, 2007).

3.6.1 Características de un bioindicador

Para que un organismo sea considerado como bioindicador, éste debe cumplir con características fundamentales, por principio la respuesta a la presencia de contaminantes debe poder medirse, su respuesta ante dichos contaminantes debe reflejar la de otros organismos, su tamaño debe ser adecuado para su examinación en el laboratorio (pueden examinarse diferentes tejidos u órganos), la respuesta debe ser proporcional al grado de exposición o degradación de contaminantes. Es importante que sea una especie sin riesgo de extinción, de fácil detección, reproducibles en cautiverio y cuyas características ecológicas y del ciclo de vida sean bien conocidas (Rueda, 2017).

2.7 *Danio rerio*

El pez cebra (*Danio rerio*) es uno de los organismos acuáticos utilizados para el biomonitoreo de contaminantes en el agua, ya que acumula en sus tejidos contaminantes (bioacumulación) a partir de diversas fuentes de exposición (Romano, 2016). *Danio rerio* pertenece a la familia de los ciprínidos, es de origen asiático y está ampliamente distribuido en las regiones monzónicas. Su rango de temperatura óptima oscila entre los 18° C y 27° C, mientras que el pH entre 6 y 8. *Danio rerio* es un organismo acuático estándar en las pruebas de toxicidad debido a su pequeño tamaño corporal (2-5 cm), fácil reproducción, rápido desarrollo y otras características (Nemtsas *et al.*, 2010). Son muy sensibles a los cambios del estrés ambiental y se han utilizado como especies modelo de organismos de agua dulce en la evaluación toxicológica de toxinas (Beltrán y Gonza, 2017). Se ha

demostrado que la respuesta del comportamiento del pez cebra a los productos químicos es un indicador útil para monitorear la calidad del agua (Qi *et al.*, 2017). Adicionalmente, dada la similitud de su genoma con el del ser humano (80% de similitud), los estudios en esta especie permiten hacer inferencias sobre especies emparentadas (Howe *et al.*, 2013).

3.8 Biomarcador

Se trata de sustancias, estructuras o procesos de un sistema biológico que se evalúan como respuesta funcional o fisiológica a los efectos negativos de contaminantes desde un nivel de célula hasta organismos, poblaciones o comunidades, por ello, al detectarse pueden evaluarse e incluso prevenirse los efectos adversos de contaminantes (INECC, 2021; Rossi *et al.*, 2016; OMS, 2001).

De este modo las señales bioquímicas, fisiológicas o ecológicas producidas por un xenobiótico son susceptibles de ser cuantificadas implementando biomarcadores, proporcionando una gran estrategia para el entendimiento y resolución de problemas medioambientales. Dicho lo anterior un biomarcador, similar a un bioindicador debe cumplir las siguientes características; ser fácilmente medible, resaltar la interrelación del organismo con el contaminante, de igual forma debe poder repetirse tanto cualitativa como cuantitativamente en el corto y largo plazo, y finalmente, debe ser preciso y exacto analíticamente en la medición (Botello, 2005).

3.8.1 Tipos de biomarcadores

A continuación, se describen los 3 tipos de biomarcadores más importantes para la evaluación toxicológica, conocidos como biomarcadores de exposición, susceptibilidad y respuesta (Repetto-Jiménez y Repetto-Khun, 2009).

3.8.1.1 Biomarcadores de exposición

Son sustancias ajenas como metabolitos o subproductos de contaminantes que se encuentran en muestras biológicas del organismo estudiado y que reflejan la cantidad de contaminante bioacumulado.

Los biomarcadores de exposición pueden clasificarse en 2 subcategorías, selectivos, los cuales son medidos de forma directa en fluidos biológicos y los no selectivos, los cuales, aunque no miden directamente la sustancia ajena pueden reflejar la exposición a la misma (Cocker *et al.*, 2014).

3.8.1.2 Biomarcadores de susceptibilidad

En comparación con los biomarcadores de exposición, estos son indicadores más específicos y sirven para identificar la sensibilidad a nivel individual a uno o varios contaminantes a partir de estudios a nivel enzimático y molecular. Un claro ejemplo de estos sería la evaluación de la expresión génica de genes objetivo, ya que es un reflejo de la capacidad genética intrínseca de un bioindicador frente a un compuesto potencialmente dañino.

Existen por un lado, los biomarcadores de polimorfismos enzimáticos de fase I basados en la medición de actividad del sistema del citocromo P450 relacionado con el metabolismo de contaminantes, los cuales posibilitan identificar la actividad enzimática relacionada con la transformación de sustancias tóxicas en el organismo. Por otro lado, se encuentran los biomarcadores de polimorfismos de sistemas detoxificantes de fase II (p. ej. Glutatión-S-transferasa) conocidos por catalizar la conjugación de diferentes xenobióticos (Repetto-Jiménez y Repetto-Khun, 2009; Sanz, 1995).

3.8.1.3 Biomarcadores de efecto

Son aquellos indicadores que permiten identificar la exposición a contaminantes mediante la determinación de cambios en el organismo a nivel bioquímico, ejemplo de ellos son alteraciones en células sanguíneas, aumento o disminución de actividad enzimática (SOD y CAT), alteración en la forma del ADN, oxidación de ciertas proteínas (carbonilación proteica) entre otros (lipoperoxidación e hidroperóxidos) (Gil y Pla, 2001).

3.9 Estrés oxidativo

Ocurre cuando un organismo tiende al aumento de radicales libres como consecuencia de un desequilibrio de mecanismos antioxidantes que conlleva a una interrupción de los mecanismos celulares, lo cual finalmente propicia un daño molecular. La determinación del estrés oxidativo permite identificar los efectos adversos inducidos por la exposición a fuentes de contaminación (Sies *et al.*, 2017).

El principal resultado de este fenómeno es la oxidación de biomoléculas como lípidos de membrana (lipoperoxidación), cambios en proteínas antioxidantes (conversión a grupos carbonilos), ácidos nucleicos (modificaciones del ADN), y la alteración del estado redox celular, así como la modificación de las enzimas antioxidantes y sus mecanismos de defensa (Valavanidis *et al.*, 2006).

Las EROs se producen naturalmente durante varias vías celulares del metabolismo aeróbico, incluida la fosforilación oxidativa, las cadenas de transporte de electrones en las mitocondrias y las microsomas, la actividad de las enzimas oxido-reductasa que producen EROs como productos intermedios o finales, o incluso reacciones inmunológicas como las mediadas por fagocitosis. Se estima que un 2-5% del oxígeno celular sufre una reducción monovalente, en lugar de una reducción bivalente, esto da origen a la generación de EROs, los cuales son átomos o moléculas que presentan electrones desapareados en su órbita externa, por ende, estos son demasiado inestables y reactivos ya que buscan constantemente recibir o entregar un electrón (Halliwell y Gutteridge, 2015).

El metabolismo celular produce principalmente aniones superóxidos (O_2^-), radicales hidroxilos ($HO\bullet$) y peróxidos de hidrógeno (H_2O_2). Las moléculas mencionadas con anterioridad pueden reaccionar rápidamente y generar otras como los radicales peróxilo ($ROO\bullet$), radicales alcóxilo ($RO\bullet$) y radicales peroxinitritos ($ONOO\bullet$), este último formado por el óxido nítrico el cual es considerado como una especie reactiva de nitrógeno. Todas estas moléculas difieren enormemente en términos de su reactividad celular y potencial para

propiciar efectos deletéreos al ADN, proteínas y lípidos poliinsaturados (Regoli y Giuliani, 2014).

En condiciones basales, los efectos adversos de los oxirradicales se previenen mediante el sistema antioxidante, que consiste en una amplia gama de depuradores de bajo peso molecular y enzimas antioxidantes que interactúan en una red sofisticada con efectos directos e indirectos (Regoli y Giuliani, 2014). Los Scavengers neutralizan las EROs por reacción directa con ellas, siendo oxidadas temporalmente antes de ser reconvertidas por reductasas específicas a la forma activa. Los Scavengers pueden desempeñar funciones antioxidantes en el citoplasma o estar diseñados para frenar la propagación de reacciones de peroxidación de lípidos en las membranas (Sies *et al.*, 2017). Un cofactor imprescindible para la efectividad de diversas enzimas antioxidantes (p. ej. peroxirredoxinas, tiorredoxinas, glutarredoxinas etc.) es el glutatión reducido (GSH), el cual es un tripéptido (γ -glutamil-cisteinil-glicina) que se encarga de neutralizar a muchas EROs al oxidarse a GSSG (Ighodaro y Akinloye, 2018).

3.9.1 Sistemas antioxidantes

Los sistemas biológicos cuentan con una variedad impresionante de procesos de oxido-reducción, cuyo objetivo principal es neutralizar los radicales libres originados por los procesos anteriormente mencionados. Las enzimas antioxidantes son las encargadas de llevar a cabo dicha defensa, estas se pueden diferenciar por su mayor afinidad de interacción con los radicales libres, respecto a cualquier otra sustancia en concentraciones normales (Sies *et al.*, 2017).

Habitualmente se tiene la idea de que los antioxidantes reaccionan cediendo electrones a los radicales libres formando como producto una molécula oxidada sin capacidad toxica para la célula y una especie reactiva neutralizada. En seguida de haber donado un electrón, un antioxidante se convierte por definición en un radical libre, no obstante, los antioxidantes en este estado no resultan dañinos, ya que tienen la habilidad de ajustarse a las modificaciones electrónicas sin tornarse reactivos. Sin embargo, existe otro tipo de antioxidantes conocidos como

enzimáticos, los cuales incrementan la velocidad de reacción entre los radicales libres y scavengers (Atta *et al.*, 2017).

El sistema antioxidante incluye enzimas antioxidantes (p. ej., SOD, CAT, GPx etc.), antioxidantes derivados de nutrientes (p. ej., ácido lipoico, α -tocoferol, selenio, vitamina C etc.), proteínas de unión a metales (p. ej., ferritina) y muchos otros más (Atta *et al.*, 2017; Silva, 2014).

A continuación, se describe brevemente el mecanismo de acción de algunos de los antioxidantes mencionados previamente:

1. α -tocoferol: reacciona con los radicales peróxilo ($\text{ROO}\cdot$) de ácidos grasos, los productos primarios de la peroxidación lipídica e intercepta la reacción en cadena.
2. La vitamina C: Actúa como donante de electrones, también tiene la capacidad de capturar radicales hidroxilos.
3. Selenio: Componente importante de enzimas antioxidantes.
4. Catalasa y GPx: Se encargan de transformar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno molecular. Además, se ha demostrado su función catalítica de descomposición de peróxidos e hidroperóxidos.
5. SOD: Cataliza la dismutación del anión superóxido altamente reactivo a O_2 y H_2O_2 .

3.9.1.1 Enzimas antioxidantes

3.9.1.2 Superóxido dismutasa

El superóxido dismutasa (SOD) es una enzima de tipo endógeno con un alto poder antioxidante, de hecho, es el principal recurso de una célula contra EROs. Su mecanismo de acción consiste en una catálisis de la dismutación de dos O_2^- en H_2O_2 y O_2 volviendo al O_2^- menos dañino (Ighodaro y Akinloye, 2018). Esta enzima

al ser una metaloenzima necesita un metal generalmente hierro, zinc, cobre o manganeso como cofactor para llevar a cabo su actividad antioxidante, por ello se pueden clasificar en Fe-SOD (presente principalmente en células procariotas), Mn-SOD (se encuentra tanto en células procariotas como eucariotas) y Cu/Zn (predomina en células eucariotas, pero también se encuentra en plantas) (Bresciani *et al.*, 2015).

3.9.1.3 Catalasa

La catalasa (CAT) es una proteína tetramérica de 240 kilodalton (kDa) con cuatro subunidades similares y está codificada por el mapeo del gen *cat* en el cromosoma 11. Cada subunidad polipeptídica tiene un peso de 60 kDa y contiene una sola ferriprotoporfirina. La CAT es una enzima antioxidante usual presente en casi en todos los seres vivos que emplean oxígeno. El hierro y el magnesio son cofactores que catalizan la reducción del H₂O₂ para quedar en solo agua y oxígeno molecular, lo cual finaliza el proceso de desintoxicación (Radi *et al.*, 1991). La catalasa (CAT) demuestra una eficiencia extraordinaria, siendo capaz de descomponer millones de moléculas de peróxido de hidrógeno en tan solo un segundo. La enzima se encuentra principalmente en los peroxisomas, pero está ausente en las mitocondrias de las células de mamíferos. Esto implica que la reducción H₂O₂ en agua y oxígeno es llevada a cabo por otra enzima conocida como glutatión peroxidasa en las mitocondrias de células de mamíferos (Claiborne, 2018). El H₂O₂, es particularmente importante por ser el sustrato de la CAT, sin embargo, en concentraciones bajas, tiende a regular mecanismos fisiológicos como el mantenimiento del equilibrio redox, el grupo tiol de las proteínas presentes en el citosol, además de que está implicado en procesos de señalización (como la proliferación y muerte celular) así como función mitocondrial. No obstante, si aumenta su concentración existe mayor riesgo celular (Claiborne, 2018). Por lo tanto, la capacidad de la CAT para limitar eficazmente la concentración de H₂O₂ en las células subraya su importancia en los procesos fisiológicos antes mencionados, además de ser una enzima de defensa

antioxidante de primera línea. La deficiencia o mutación de la enzima se ha asociado con variedad enfermedades y anomalías (Chelikani *et al.*, 2004).

3.9.2 Mecanismos de oxidación celular

3.9.2.1 Lipoperoxidación

Es el proceso de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, este mecanismo juega un rol importante en la evolución de organismos vivos y sus adaptaciones a una variedad de ambientes. La LPX se atribuye al estrés en organismos producto de cambios en las condiciones naturales y antropogénicas. En años recientes ha habido un interés considerable en el uso de biomarcadores dentro de especies acuáticas, esto debido a que forman el principal recurso de alimento para las personas, y contienen muchos compuestos esenciales incluyendo antioxidantes, ácidos grasos insaturados, carotenoides, vitaminas etc. Los parámetros de LPX son buenos biomarcadores, caracterizando el estrés oxidativo en organismos acuáticos causado por tóxicos contenidos en efluentes o descargas residuales. Por otro lado, los niveles de LPX en animales dependen del estatus fisiológico, estado de desarrollo, edad, condiciones abióticas (variaciones estacionales, temperatura, concentración de oxígeno, condiciones fisicoquímicas en el hábitat, etc.), factores bióticos (composición del alimento, infecciones microbianas o parasitarias) y el impacto antropogénico (Kancheva y Angelova, 2017).

La membrana lipídica presente en todas las células eucariotas al ser abundante en ácidos grasos polinsaturados es susceptible al ataque de diversos radicales libres que tienen como desenlace la LPX. Los pasos de la LPX se describen brevemente a continuación (Figura 2), la fase inicial consiste en el ataque por parte de un hidroxilo el cual extrae un átomo de H del carbono localizado entre dos carbonos que presentan doble enlace de un ácido graso poliinsaturado como lo es el ácido araquidónico, dando como resultado un carbono con un electrón desapareado (radical lípido L•). A continuación, el radical lípido es estabilizado por resonancia generando un dieno conjugado de lípido.

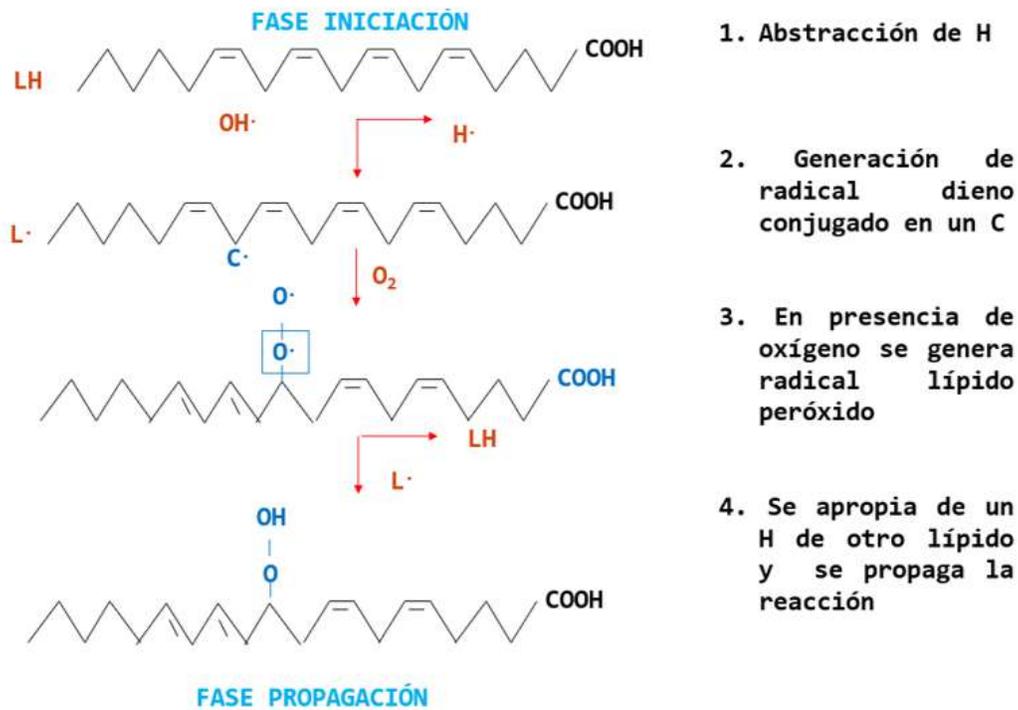


Figura 2. Reacción global de la lipoperoxidación.

Durante la fase de propagación, el dieno conjugado de lípido interacciona con el O_2 y genera un radical peróxido de lípido ($LOO\cdot$), este tiene potencial de abstraer otro átomo de H de otro ácido poliinsaturado contiguo, dando lugar a un hidroperóxido de lípido ($LOOH$) y otro $L\cdot$. Este último radical tiene el potencial de interactuar con otra molécula de O_2 para generar un $LOO\cdot$. En este sentido se desencadena una propagación cíclica de LPX, cuya finalización está sujeta a la concentración de antioxidantes y radicales libres.

La fase de culminación de la LPX puede ocurrir por recombinación de radicales o por interacción con agentes antioxidantes, para generar productos no radicalarios. Dos moléculas radicalarias pueden interactuar y dar lugar a productos no radicalarios altamente estables (Figura 3). A su vez, los radicales lipídicos pueden reaccionar con scavengers, como es el caso de GSH, ácido ascórbico, α -tocoferol o finalmente puede ocurrir la combinación de $LOO\cdot$ ó un radical libre y un $LOO\cdot$ (Kancheva y Angelova, 2017; Rojano *et al.*, 2008).

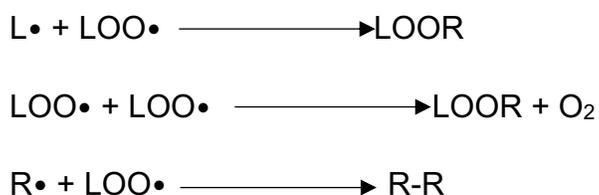


Figura 3. Culminación LPX.

3.9.2.2 Hidroperóxidos

Como se comentó anteriormente, dentro del proceso de LPX se originan (LOOH), los cuales pueden descomponerse por la interacción de estos con metales como el Cu^{+2} ó Fe^{+2} . La degradación ocasiona la génesis de productos secundarios como etano, pentano, epóxidos, cetonas y algunos aldehídos potencialmente reactivos, tal es el caso del malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) y 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Halliwell y Gutteridge, 2015).

MDA y HNE son los principales aldehídos reactivos generados después de la LPX de ácidos grasos poliinsaturados (p.ej. ácido linoleico). Se ha estudiado ampliamente su reactividad con proteínas y ADN, por ende, se caracterizan por ser compuestos altamente citogenotóxicos (Muñiz *et al.*, 2014).

3.9.2.3 Proteínas carboniladas

Las proteínas celulares están sometidas a un proceso de recambio continuo (síntesis/degradación). Los mecanismos degradativos, aparte de ser los responsables del recambio basal de proteínas en condiciones metabólicas normales, intervienen en otros muchos procesos celulares tales como: crecimiento, diferenciación tisular, defensa inmunitaria y en determinados procesos patológicos como en los procesos de oxidación (Cárdenas *et al.*, 2013).

Los radicales libres actúan sobre proteínas, de hecho, se generan y propagan a través de estas. Los daños por los radicales libres se inician por la liberación de un electrón mediante reacciones químicas complejas que resultan en la producción de alteraciones como la generación de grupos carbonilos, esta oxidación es

básicamente dependiente de los radicales $O_2\bullet$ y $HO\bullet$ (Vicedo-Tomey y Vicedo-Ortega, 2000).

Las proteínas tienen aminoácidos que son más sensibles que otros a la oxidación, tal es el caso de la cisteína, el triptófano, la valina, la fenilalanina y la metionina. Diferentes sistemas han demostrado la capacidad del 4-hidroxinonal y el malondialdehído, productos finales de la lipoperoxidación, de poder unirse covalentemente a diversas proteínas, dichas proteínas alteradas muestran una gran susceptibilidad a la proteólisis. Cuando las células se exponen a la acción de radicales libres se activan enzimas proteolíticas que pueden causar un incremento de la susceptibilidad a la proteólisis y/o una violenta proteólisis de proteínas oxidativamente modificadas (Dean *et al.*, 1997).

Finalmente, en humanos se ha observado que entre más proteínas carboniladas tenga, existe mayor riesgo de presentar algunas patologías como el asma, la diabetes o la anemia (Méndez-Cuadro, 2011).

3.10 Apoptosis

Las células se rigen por un ciclo celular con fases bien definidas, cuando existe algún tipo de alteración como el estrés oxidativo, se activan algunos mecanismos que inducen dependiendo el daño, una pausa o la muerte celular programada conocida como apoptosis.

Se trata entonces de un proceso de muerte celular natural que garantiza el adecuado desarrollo y homeostasis de organismos pluricelulares. Este proceso también es importante para eliminar las células dañadas, infectadas o potencialmente neoplásicas. Es un proceso celular claramente diferenciado de la necrosis (Goodman, 1996; Schwartzman y Cidlowski, 1993). En la necrosis, la integridad de la membrana celular se ve gravemente comprometida o dañada, lo que conduce a la hinchazón y la lisis celular. A menudo, la necrosis se produce en un grupo de células o en un tejido en un lugar concreto. En cambio, la apoptosis se produce a nivel de una sola célula. Durante este proceso, una célula individual sufre un proceso activo de muerte celular, puesto en marcha por un programa

genético y que culmina con la fragmentación del ADN y la formación de trozos empaquetados en la membrana llamados cuerpos apoptóticos. La membrana plasmática de las células apoptóticas tempranas y los cuerpos apoptóticos mantienen su integridad, impidiendo la fuga de material celular y, por tanto, una respuesta inflamatoria y un daño tisular local. Los cambios bioquímicos en la superficie externa de la membrana plasmática son reconocidos por los macrófagos del tejido y otros tipos de células vecinas. Las células apoptóticas son eliminadas eficazmente in vivo por las células de procesamiento de antígenos en 2-4 h (Kiechle y Zhang, 2002; Schwartzman y Cidlowski, 1993).

La apoptosis puede ser desencadenada por numerosos factores, entre ellos las señales mediadas por receptores, la retirada de factores de crecimiento y en determinadas condiciones, los daños en el ADN (Kiechle y Zhang, 2002; Buttke y Sandstrom, 1994; Schwartzman y Cidlowski, 1993). Existen múltiples mecanismos de reparación del ADN, p. ej. reparación por escisión de base y nucleótidos, recombinación homóloga, unión de extremos no homólogos, reparación de desajustes e inversión directa. Sin embargo, si el deterioro del ADN no es reparado correctamente para evitar células con alteraciones genéticas, se activa la vía de muerte celular programada (Roy *et al.*, 2018).

Existen diferentes estímulos que generan una activación específica que conduce a la activación del proceso apoptótico, sin embargo, todos parecen converger en una secuencia de eventos altamente conservada a nivel evolutivo (Wertz y Hanley, 1996). Las caspasas son el componente central de este programa apoptótico. Aunque la señal inicial para la programación apoptótica puede variar, las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis son uniformemente similares, y están altamente conservadas durante la evolución de las especies (Salvesen y Dixit, 1999; Cohen, 1997)

Las caspasas son enzimas cisteína-dependientes y son sensibles al estado redox de la célula. Estas proteasas de cisteína se sintetizan como precursores que tienen poca o ninguna actividad catalítica (Salvesen y Dixit, 1999; Cohen, 1997). El precursor suele convertirse en la proteasa activa mediante un procesamiento

proteolítico. Una de las funciones de las caspasas es inactivar las proteínas vitales para la supervivencia celular. Estas enzimas cortan el contacto célula-célula con las células circundantes, desorganizan el citoesqueleto, detienen la replicación y reparación del ADN, interrumpen el empalme, destruyen el ADN, alteran la estructura nuclear, inducen cambios bioquímicos en la superficie celular para facilitar el reconocimiento por parte de los fagocitos y, finalmente, desintegran la célula en cuerpos vesiculares (Henkart, 1996). En la actualidad se han identificado 13 caspasas diferentes y se están añadiendo más a la lista. Sin embargo, el inicio de los eventos apoptóticos depende de la capacidad de los complejos de señalización para generar una proteasa activa (Salvesen y Dixit, 1999; Cohen, 1997; Wertz y Hanley, 1996). La apoptosis intrínseca es una muerte celular centrada en la mitocondria que está mediada por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (PMEM), lo cual da como resultado la formación de apoptosomas, seguido de la actividad catalítica de la caspasa 9 y finalmente la activación del resto de caspasas efectoras (Brentnall *et al.*, 2013). La abstinencia del factor de crecimiento y el estrés oxidativo intracelular pueden inducir la apoptosis a través de la vía de muerte celular intrínseca, mientras que la apoptosis extrínseca se inicia a través de los receptores de muerte transmembranal (Fas, TNF-R1, CAR1, DR3, DR4, DR5, FADD etc.). La iniciación y ejecución de estos procesos están reguladas por las familias de proteínas BCL-2 y caspasas (Galluzzi *et al.*, 2012). La activación de los miembros de la familia BAX da como resultado PMEM y la liberación de proteínas proapoptóticas, incluido el citocromo c, desde el espacio intermembranal mitocondrial hacia el citosol (Wei *et al.*, 2001). El citocromo c puede unirse a Apaf-1 formando el apoptosoma y activando la caspasa-9. Una vez activa, la caspasa-9 puede escindir y activar directamente la caspasa-3 y la caspasa-6 y 7 (Cohen, 1997).

El exceso de estrés oxidativo mata a las células por necrosis o por apoptosis (Zamzami *et al.*, 1995; Buttke y Sandstrom, 1994). En muchos modelos de apoptosis, la alteración del estado redox de la célula a un ambiente más oxidante se genera previo a la activación de las caspasas efectoras finales (Zamzami *et al.*, 1995). La suposición anterior está respaldada por la capacidad de diversos

antioxidantes de impedir la apoptosis en una forma semejante a como los inhibidores de caspasas lo realizan. El mejor ejemplo es ilustrado por la N-acetilcisteína (NAC). (McGowan *et al.*, 1996). Aunado a esto, las características antioxidantes de la molécula Bcl 2, un potente inhibidor de la muerte celular, reafirman en mayor medida la teoría planteada (Hockenbery, 1995). Bajo situaciones habituales, las células aeróbicas se encuentran equipadas con diversos mecanismos de defensa antioxidante para hacer frente a los efectos dañinos de las EROs (Sies *et al.*, 2017). Cuando los mecanismos prooxidantes superan los mecanismos de defensa antioxidantes, se produce el estrés oxidativo. Por tanto, la apoptosis (Figura 4) puede servir como dispositivo de seguridad para evitar que las células proliferen sin control ante un estrés oxidativo persistente (McGowan *et al.*, 1996; Buttke y Sandstrom, 1994).

Existe una relación dinámica entre la generación de EROs y la capacidad antioxidante del sistema celular en cuestión. Algunos procesos de oxidación, como la oxidación de la cisteína, intervienen en un proceso dinámico de regulación dentro de la célula (Kannan y Jain, 2000). Esta variación puede provocar una modulación drástica de la proporción oxidada o reducida de las proteínas de señalización, como, por ejemplo, los factores de transcripción. Se ha demostrado que factores transcripcionales como NF- κ B, p53 y AP-1 son modulados por EROs (Morel y Barouki, 1999; Goodman, 1996). La producción sutil de EROs, por tanto, puede interferir en las vías de transducción de señales. Las EROs, en particular el H₂O₂, son de hecho segundos mensajeros de varios estímulos fisiológicos, como las citoquinas inflamatorias de la angiotensina y los factores de crecimiento o de transformación (Regoli y Giuliani, 2014; Bae *et al.*, 1997). La expresión génica, en general, está modulada tanto por estímulos fisiológicos como ambientales. Finalmente, se ha demostrado que el estrés oxidativo actúa como modulador pleiotrópico en ambas vías. De hecho, las EROs se han descrito como segundos mensajeros de varios factores de crecimiento y citoquinas (Morel y Barouki, 1999).

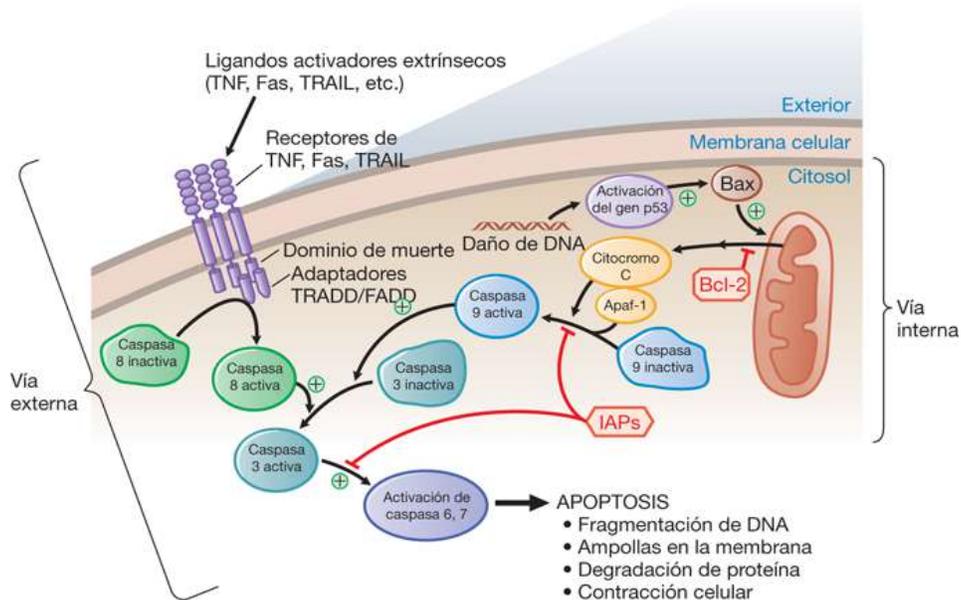


Figura 4. Mecanismo de apoptosis. Tomado de Goodman, 1996.

3.11 Expresión génica

La expresión genética representa un criterio de valoración sensible. Los efectos de las sustancias químicas se manifiestan principalmente al interactuar con procesos moleculares (toxicodinámica) que conducen directa o indirectamente a alteraciones en la abundancia de ARNm. Estas interacciones pueden ocurrir a diferentes niveles. Un compuesto podría interferir con la integridad de la membrana, unirse o reaccionar con proteínas, lípidos y ADN. Por último, pueden alterarse importantes funciones celulares que conducen a la muerte de la célula o del organismo. Los cambios moleculares que acompañan a estos mecanismos pueden estar relacionados con procesos adaptativos o con la mediación de efectos tóxicos (Girardot *et al.*, 2004). En los casos en que, los criterios de valoración toxicológicos convencionales no detectan efectos obvios, se ha demostrado que la toxicogenómica (expresión génica) presentan una ventaja ya que es posible identificar efectos nocivos producto de la exposición a contaminantes emergentes cuya concentración oscila en el orden de ng- μ g/L. (Heinloth *et al.*, 2004). Finalmente, los cambios en los niveles de expresión génica

revelan información mecanicista adicional, que no podría obtenerse mediante los criterios de valoración tóxicos clásicos (Völker, 2007).

3.11.1 Fundamentos de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica enzimática que tiene como finalidad la amplificación exponencial de cientos de secuencias genómicas específicas. Para ello el proceso requiere de la repetición de ciclos dentro del cual la secuencias objetivo son copiadas fielmente. Para esto, es necesario emplear la enzima ADN polimerasa (Taq polimerasa) la cual proviene de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. La enzima se encarga de sintetizar hebras complementarias utilizando como molde una hebra guía que corre de 5' a 3'. El proceso puede emplear como molde ADN genómico o bien complementario (ADNss o ADNds) el cual deriva del ARNm. Este último se le conoce como RT-PCR (Reverse transcription-PCR). Para obtener ADN complementario es necesario la implementación de la enzima retrotranscriptasa. Dicha técnica se emplea cuando existe interés en analizar la expresión de un gen en particular (Haydel y Stout, 2015; Mullis *et al.*, 1986).

Los componentes necesarios para la PCR constan del templado, es decir el ADN genómico o complementario, la enzima Taq, los cebadores (primers por sus siglas en inglés), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) empleados como bloques de construcción (Citosina, guanina, timina y adenina), MgCl₂, solución tampón y agua. Los factores descritos interaccionan en las etapas de la PCR; desnaturalización, alineación y extensión (Figura 5). Debido al cambio drástico de temperaturas en cada una de estas fases y ciclos, es necesario equipos sofisticados, tal es el caso de los termocicladores. Una vez completado la reacción es necesario ratificar si la secuencia objetivo fue amplificada correctamente. Por tal motivo, es necesario correr geles de agarosa, usualmente al 1% (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

3.11.1.1 Desnaturalización

Cuando las hebras de ADN son sometidas a temperaturas altas (95 °C) por poco menos de 20-60 s estas se separan, este proceso se encuentra relacionado con la proporción Guanina-Citosina, ya que a mayor cantidad de enlaces triples de hidrógeno, mayor tiempo de desnaturalización será necesaria para la obtención de hebras sencillas de ADN. Sin duda alguna, este proceso está sujeto a la velocidad en la cual el termociclador incrementa y disminuye la temperatura. Después de concluir la etapa, se obtendrán hebras desnaturalizadas que funcionarán como molde para los pasos subsecuentes.

3.11.1.2 Alineamiento

Una vez realizada la desnaturalización, es necesario alinear los cebadores con la hebra molde, esto se consigue con la disminución de la temperatura la cual regularmente oscila entre 50-60 °C, cabe destacar la importancia de este rango para la formación del complejo cebador-templado. A esta temperatura se le denomina temperatura de hibridación (T_m). Es necesario puntualizar que cuando se diseñan los cebadores forward y reverse estos deben poseer una T_m similar, para que se empalmen al extremo 5' y 3' respectivamente, y posteriormente la Taq polimerasa corra en dicha dirección. De otra forma la especificidad del amplicón no será eficiente.

3.11.1.3 Extensión

Durante esta etapa la enzima Taq polimerasa, actúa sobre el complejo previamente formado cebador-templado y comienza la función catalítica en dirección de 5' a 3'. La temperatura optima es de 72 °C, al finalizar la etapa se habrán sintetizados los amplicones correspondientes cuya longitud final en pares de bases debe ser conocido para finalmente correr un gel de agarosa y verificar la migración del ADN.

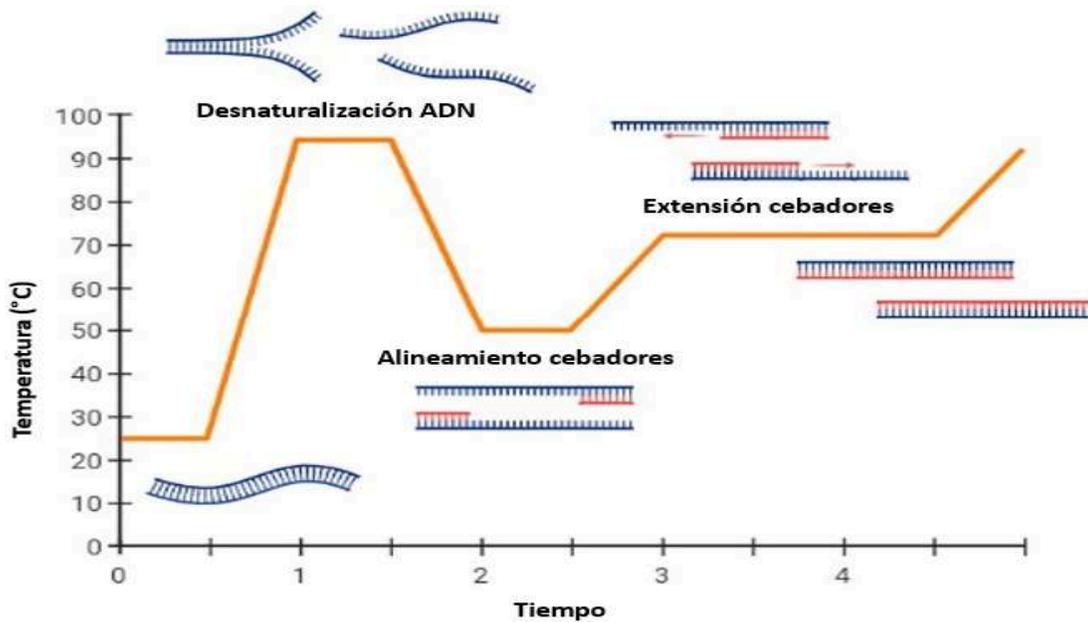


Figura 5. Cinética de amplificación de la PCR. Fuente: Elaboración propia (2022).

3.12 RT-qPCR

El fundamento teórico es similar a una PCR convencional, con la salvedad de la manera en cómo se detectan los productos amplificados. La qPCR tiene la posibilidad de monitorear la amplificación a lo largo del tiempo, en vez de al final como en la PCR convencional. En este sentido cuanto mayor sea la cantidad de copias iniciales de ADNc (Secuencias del RNAm), en menor tiempo se podrá visualizar la fluorescencia emitida por el reportero. En función del método de obtención de ADN, se puede denominar qPCR (ADN genómico) o RT-qPCR (ADN complementario) (Jia, 2012). En general los factores químicos a emplear son similares a la PCR tradicional, la diferencia radica en el fluoróforo (p. ej. SYBR Green) empleado para monitorear los amplicones, el cual generalmente está incluido en la master mix. Como se mencionó anteriormente los cebadores deben ser diseñados con especial cuidado para asegurar una alta especificidad, por ende, se recomienda un tamaño de amplicón que oscile entre 100-150 pares de bases, en caso de ser más grandes es muy probable que se puedan generar dímeros de cebadores o horquillas en las secuencias objetivo.

3.12.1 Cinética de la PCR en tiempo real

En el proceso de amplificación de la PCR en tiempo real, la cinética de la reacción refleja una señal de la fluorescencia en cada uno de sus ciclos, de tal forma que pueden delimitarse cuatro fases de la acumulación de fluorescencia. En la fase inicial o también denominada basal ocurre entre los primeros 10 y 15 ciclos, en esta fase es poca la fluorescencia que se genera como para diferenciarla del ruido basal, sin embargo, puede delimitarse la línea base para su posterior cuantificación. La segunda fase se denomina geométrica, logarítmica o exponencial, como su nombre indica ocurre un crecimiento acelerado ya que de cada molécula de ADN se generan dos moléculas más, es decir, después de cada ciclo se duplica la cantidad del amplicón.

Cuando se empiezan a ver limitados los reactivos de la reacción, ocurre la fase lineal. En esta fase se observa una disminución de la actividad enzimática. Finalmente, la fase estacionaria da una señal de saturación y se interrumpe la amplificación por agotamiento de los componentes de la reacción. Durante las cuatro fases de la amplificación de la PCR en tiempo real se observa un incremento progresivo de la emisión de fluorescencia de forma proporcional al ciclo de reacción (Figura 6).

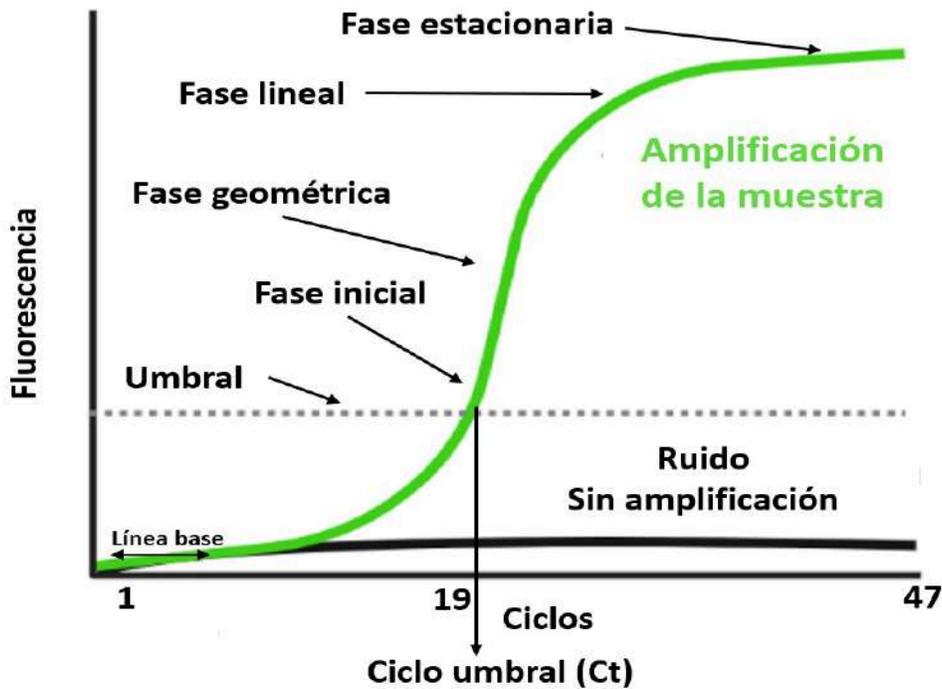


Figura 6. Cinética de amplificación de la q-RT-PCR. Este gráfico muestra las cuatro fases de la cinética de amplificación. Fuente: Elaboración propia (2022).

Cabe señalar que el ciclo umbral (Ct), es el ciclo a partir del cual la fluorescencia supera el umbral y es detectado por el termociclador. Para analizar la expresión relativa de genes objetivos es necesaria la comparación de los valores de ciclo umbral por cada muestra y gen evaluado, ya que de este modo es posible calcular la diferencia entre la cantidad inicial de ADN que se desea evaluar. De tal modo que, mientras se tenga una mayor concentración de ADN objetivo en las muestras, menor será el número de ciclos (Ct) requeridos para alcanzar dicho umbral. Por ello, el número del ciclo umbral de cada muestra es inversamente proporcional a la cantidad inicial de material genético presente en ella. Al finalizar la qRT-PCR es recomendable realizar una curva de disociación (curva melting) el cual consiste en un aumento gradual de temperatura de los productos de amplificación, a dicha curva debe realizarse una derivada negativa y el programa asociado al termociclador debería de arrojar una curva con un solo pico alrededor de los 85

°C, pero no debe ser menor a 80 °C, ya que de otro modo sería un reflejo de la inespecificidad durante la amplificación. Otra forma de evaluar lo anterior sería corriendo un gel de agarosa al 1% (Álvarez-López, 2016; Jia, 2012).

3.12.1.1 Métodos de detección de los productos amplificados

Conforme el tiempo de reacción transcurre es imprescindible el monitoreo de los productos de amplificación de la qRT-PCR, por tal motivo es necesario utilizar reporteros de fluorescencia. En general, es posible diferenciar dos grandes sistemas de clasificación con base a la metodología: específicos e inespecíficos. (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

3.12.1.1.1 Métodos no específicos

Se fundamenta en el empleo de moléculas intercalantes las cuales presentan afinidad por las moléculas de ADNds, ya que al ser oxidadas generan una fluorescencia en una determinada longitud de onda el cual es detectado por un sensor en el termociclador en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional a la cantidad de copias de ADNds. En general el fluoróforo mayormente empleado corresponde al SYBR Green ya que es una molécula cargada positivamente, la cual no emite fluorescencia y permanece dissociada del ADNss, no obstante, cuando existen ADNds incrementa su fluorescencia hasta en 1000 veces y emite a 520 nanómetros (Figura 7).

3.12.1.1.2 Métodos específicos

Esta clase de tecnologías, en general son más costosas, sin embargo, presentan una mayor afinidad por la secuencia nucleotídica específica. Se basan en el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente. Estos métodos radican en la transferencia de energía desde un donador o fluoróforo unido al extremo 5' a un aceptor o quencher (desactivador de fluorescencia) localizado en el extremo 3'. De tal forma que no se logra emitir fluorescencia cuando estas sondas se encuentran próximas entre sí. Sin embargo, cuando la Taq polimerasa comienza a sintetizar la cadena naciente con dirección 5' a 3' utilizando la hebra

molde 3' a 5' la actividad exonucleasa de la polimerasa degrada la sonda y libera al reportero (p. ej. Tetraclorofluoresceína o 6-carboxifluoresceína). Por tanto, la fluorescencia percibida por los sensores del termociclador es directamente proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado de novo.

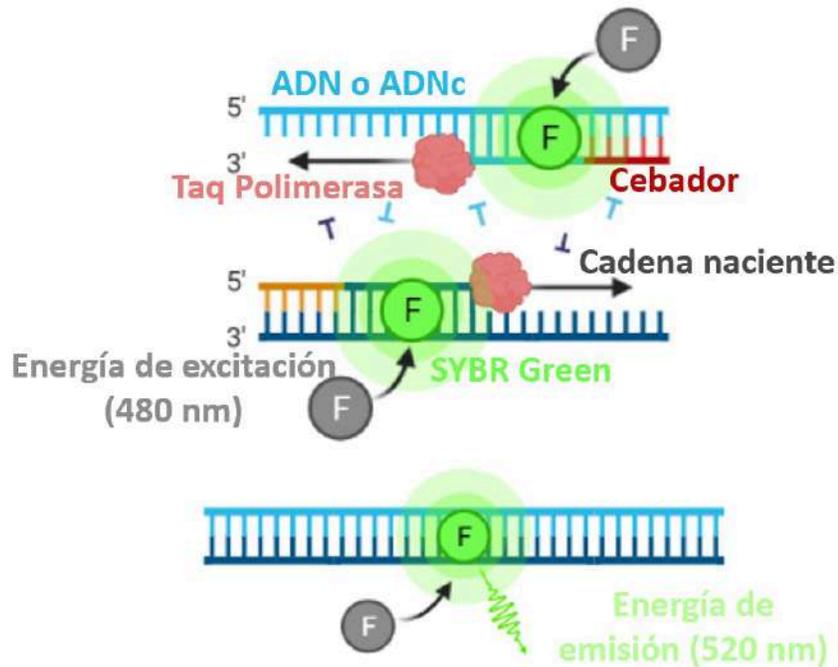


Figura 7. Método no específico. SYBR Green unido al ADN de doble cadena. Fuente: Elaboración propia (2022).

3.12.2 Técnicas de cuantificación

Habitualmente se utilizan dos estrategias para la cuantificación de la expresión génica en qRT-PCR. Las técnicas consisten en una cuantificación absoluta o relativa.

3.12.2.1 Cuantificación absoluta

Es el proceso que consiste en determinar la concentración exacta del gen objetivo por cada muestra de estudio a partir de estándares con un número conocido de moléculas iniciales, utilizando una curva de calibración, la cual emplea diluciones seriadas de concentraciones conocidas. Por tanto, la cantidad de moléculas se

cuantifica en función de una extrapolación de la recta generada por los estándares.

3.12.2.2 Cuantificación relativa

Este proceso se sustenta en la medición del nivel del ARNm del gen de interés comparado con el gen constitutivo (p.ej. actina o GPDH etc.) ya que en este último el ARNm se mantiene constante sin importar los cambios fisiológicos, por esta razón, es útil para evaluar modificaciones de la expresión genética en diferentes estados fisiológicos.

Como se mencionó anteriormente los resultados de esta cuantificación son determinados por el gen de referencia y pueden ser interpretados en función de si hay cambios o no respecto a este gen. En la cuantificación relativa no es necesaria una curva de calibración a partir de un estándar conocido de concentración como en el caso de la cuantificación absoluta (Pinilla *et al.*, 2008).

Para realizar la cuantificación relativa, son necesarios los valores Ct de cada muestra, los cuales serán comparados respecto al Ct control. Este método se denomina $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y solo es válido aplicarlo si se requiere estimar rápidamente la proporción relativa de la expresión del gen estudiado. Básicamente el método consiste en estimar la proporción relativa de la expresión de un gen de interés como se muestra a continuación (Schmittgen y Livak, 2008; Álvarez-López, 2016).

$$\Delta Ct1 = Ct (\text{Gen interes tratado}) - Ct (\text{Gen housekeeping tratado})$$

$$\Delta Ct2 = Ct (\text{Gen interes control}) - Ct (\text{Gen housekeeping control})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 (\text{tratadas}) - \Delta Ct2 (\text{control})$$

$$\text{Cuantificación relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.13 Secuenciación

Hace alusión al conjunto de técnicas bioquímicas, cuya finalidad es determinar la secuencia de nucleótidos presentes en un fragmento específico de ADN. Existen diversos métodos que facilitan la tipificación de comunidades bacterianas en una muestra ambiental. Históricamente en 1975, Sanger aportó el método de secuenciación del ADN cuyo principio fundamental se basa en la síntesis del ADN con ayuda de la ADN Polimerasa. En este sentido, fue posible determinar por primera vez las secuencias nucleotídicas de regiones específicas de ADN (Sanger y Coulson, 1975). No obstante, debido a las desventajas inherentes a la técnica y a los avances tecnológicos en materia de secuenciación, el proceso fue optimizado hasta llegar a las plataformas de secuenciación masiva de última generación, NGS (por sus siglas en inglés). A continuación se describen algunas de las plataformas NGS más empleadas (Hu *et al.*, 2021).

3.13.1 Illumina

La tecnología de secuenciación de Illumina emplea un enfoque diferente al método clásico de Sanger. Se basa en la tecnología de secuenciación por síntesis, que permite rastrear la incorporación de nucleótidos marcados a medida que se replica masivamente la cadena de ADN. Finalmente, este sistema de secuenciación tiene la capacidad de generar datos que van desde 300 kilobases hasta varias terabases en una sola corrida, dependiendo del tipo de instrumento y su configuración.

3.13.2 PacBio

La presente plataforma emplea una técnica denominada como secuenciación molecular en tiempo real. PacBio utiliza celdas de flujo con alta especificidad y con cientos de pozos individuales, los cuales cuentan con guías de onda de modo cero. Posteriormente, la DNA Polimerasa se ancla al fondo de cada pocillo, de tal forma que se permite que la hebra de ADN circule a través de las guías de onda de modo cero. Este tipo de secuenciación permite obtener imágenes en tiempo real de nucleótidos marcados con fluorescencia que se sintetizan junto con

moléculas molde de ADN individuales. La reacción de secuenciación termina cuando la plantilla y la polimerasa se disocian. La longitud de lectura promedio del instrumento PacBio es de aproximadamente 2 kb y algunas lecturas pueden superar los 20 kb. Las lecturas más largas son especialmente útiles para ensamblajes de novo de genomas novedosos que pueden abarcar muchas más repeticiones y bases.

Los elementos altamente repetitivos que se encuentran tanto en los genomas eucariotas como en los procariotas plantean un desafío para el ensamblaje del genoma y dificultan el estudio detallado de las secuencias repetitivas. Ofrece lecturas superiores a varias docenas de kilobases (kbs), que pueden abarcar regiones complejas o repetitivas con una sola lectura continua, lo que permite la resolución de estas grandes características estructurales.

3.13.3 Ion Torrent

Ion Torrent emplea una técnica novedosa basado en el uso iones semiconductores. Este método de secuenciación se fundamenta en la detección de iones de hidrógeno, liberados durante la síntesis del ADN. La plataforma cuenta con múltiples pocillos, los cuales resguardan una hebra de ADN molde. Posteriormente a cada pocillo se le agregan desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs). En este sentido, si el dNTP que ingresa al pocillo, es complementario al ADN molde, se integra a la cadena en crecimiento. Por consiguiente, la incorporación particular de cada dNTP (Adenina, guanina, citosina y timina) a la cadena nascente de ADN, desencadena el desprendimiento de un ion de hidrógeno que finalmente activa el sensor de iones y permite conocer la secuencia nucleotídica exacta.

Es necesario tener en consideración que la incorporación de cada dNTP a la hebra molde, trae consigo la generación de un enlace covalente y liberación de iones de hidrogeno y pirofosfato. Por tal motivo, la secuenciación de Ion Torrent explota al máximo la naturaleza de los hechos comentados con anterioridad. La liberación de hidrogeno cambia el pH de la solución y es detectado por el sensor

de iones. Finalmente, el dNTP que no se unió a la hebra, es desechado antes del siguiente ciclo que emplea un dNTP diferente.

3.14 Metataxonómica y Metagenómica

Los enfoques metataxonómicos suelen utilizar genes de ARNr como diana molecular (16S para bacterias, 18S ARNr para parásitos, espaciador transcrito interno, ITS, para hongos) y brindan secuencias que, en función de la plataforma de secuenciación empleada, nos ayuda a identificar a nivel de género y, a veces (cuando las secuencias obtenidas son más largas, ≈500 pb) a nivel de especie, proporcionando un nivel de sensibilidad elevado. Por otro lado, la metagenómica analiza la totalidad del contenido genómico de una muestra ambiental. Es decir análisis víricos, bacterianos, eucariotas, resistoma (genes de resistencia antimicrobiana) entre otros genes objetivo. Actualmente, para llevar a cabo cualquiera de los dos enfoques mencionados con anterioridad, es necesario la secuenciación de amplicones o shotgun, según sea el objetivo (Handelsman *et al.*, 1998).

3.14.1 Secuenciación de amplicones

Se usa para dilucidar la composición o dinámica comunitaria de una muestra ambiental. Consiste en obtener el ADN de los organismos que existen en una muestra ambiental. En seguida se emplea un marcador molecular que nos permita diferenciar taxonómicamente a un conjunto de organismos de interés (p. ej. 16S ARNr), el cual es amplificado mediante PCR utilizando cebadores específicos para dicha región (341F y 805R). Finalmente los amplicones son secuenciados y analizados mediante herramientas bioinformáticas con la finalidad de caracterizar las comunidades bacterianas y conocer su abundancia relativa (Ranjan *et al.*, 2016).

3.14.2 Secuenciación de shotgun

Este enfoque es mayormente utilizado para identificar el potencial metabólico (genes) de los integrantes de la comunidad bacteriana (metagenómica funcional) (Ranjan *et al.*, 2016). Se obtiene el ADN metagenómico, sin embargo, este es

cortado en diversos fragmentos que después son amplificados y secuenciados. A partir de lo anterior se obtiene millones de secuencias que son analizadas por programas bioinformáticos que permiten alinear y generar secuencias más largas (contigs) y posteriormente scaffolds para finalmente descifrar los genes que aportan información sobre las funciones biológicas de las comunidades estudiadas (Ranjan *et al.*, 2016)

3.14.3. Herramientas bioinformáticas para análisis metataxonómicos

La NGS trajo consigo la necesidad de procesar grandes cantidades de secuencias por ende, con el paso del tiempo se desarrollaron nuevos e innovadores programas bioinformáticos. Uno de los más utilizados es Mothur, el cual es un software de código abierto ampliamente utilizado para analizar e interpretar secuencias crudas provenientes de diversos métodos de secuenciación, incluida Illumina HiSeq y MiSeq, Ion Torrent , pirosecuenciación 454, PacBio e incluso Sanger. Este software permite la asignación taxonómica, análisis de diversidad α y β , entre otras herramientas (Kozich *et al.*, 2013).

4. Antecedentes

El estudio de los efectos de xenobióticos en organismos acuáticos es útil para averiguar cómo se distribuyen dichos compuestos, como se transportan, a donde llegan y con ello proporcionar información de utilidad para tomadores de decisiones en materia ambiental ya que en muchas ocasiones la carencia de información eco y toxicológica limita la legislación ambiental.

De acuerdo con Toro-Restrepo (2011) el monitoreo de los efectos de la contaminación hídrica sobre organismos acuáticos permite establecer el comportamiento espacial de la contaminación, explicar las relaciones de causa y efecto, así como identificar la problemática que causan en el medio ambiente.

Los estudios de toxicidad en organismos acuáticos son procedimientos comúnmente utilizados para evaluar los posibles efectos perjudiciales de diversos contaminantes en matrices acuáticas. Los peces cumplen un rol crucial en las redes tróficas acuáticas, ocupando una posición intermedia o superior, ya que no solo se alimentan de una variedad de depredadores acuáticos, sino que también son una fuente importante de alimento para las poblaciones humanas a nivel global (Li y Lin, 2015).

En la actualidad se ha estudiado el efecto tóxico de algunos compuestos químicos en especies acuáticas tales como fármacos, hormonas esteroideas, solventes y metales pesados, algunas de estas sustancias pueden encontrarse en efluentes hospitalarios (Orozco-Hernández *et al.*, 2019; Cortes-Díaz *et al.*, 2017; García-Medina *et al.*, 2017; Levet *et al.*, 2016).

Asimismo, se han llevado a cabo pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad en diferentes especies acuáticas (Bonciu *et al.*, 2018; Islas-Flores *et al.*, 2017). No obstante, una forma diferente de evaluar los posibles daños toxicológicos de los xenobióticos sobre organismos de respuesta es a través de la cuantificación de los mecanismos oxidantes y antioxidantes a nivel bioquímico y genético, los cuales están íntimamente relacionados con los procesos de estrés oxidativo en sistemas biológicos. De hecho, se ha evidenciado que, ante exposiciones agudas a

compuestos como insecticidas de tipo organofosforados o hidrocarburos aromáticos existe daño en las células por estrés oxidativo acompañado de un incremento de la actividad enzimática antioxidante principalmente en tejido hepático y branquias (Ochoa y González, 2008; Ahmad *et al.*, 2000). Por otro lado, también se ha reportado que ante altos niveles de contaminación se ve disminuida la concentración de antioxidantes, generando repercusiones importantes en los seres vivos (Belaid y Sbartai, 2021; Abdel-Khalek *et al.*, 2020; Cid *et al.*, 2018).

A continuación, se mencionan algunas de las investigaciones más relevantes respecto al objeto de estudio y que permitieron establecer los objetivos de la presente investigación (Tabla 2).

Se ha evaluado el estrés oxidativo determinando la expresión génica relacionada con el mecanismo antioxidante celular de fármacos ubicuos de efluentes hospitalarios como es el caso del paracetamol, el cual afecta significativamente las expresiones de factores transcripcionales (*nrf1*) y genes relacionados con mecanismos antioxidantes (*gst*, *gpx*, *cat*, *trx*, *trxr* y *prx1*) en *Daphnia magna*, existiendo relación con el tiempo de exposición y la concentración del fármaco (S. Liu *et al.*, 2019).

Neri-Cruz *et al.*, (2015) informó que un efluente hospitalario de la Ciudad de Toluca contiene una mezcla de antiinflamatorios no esteroideos, metales pesados y NaClO, lo cual indujo estrés oxidativo principalmente en branquias, cerebro e hígado en *Cyprinus carpio*. Los cambios observados en los biomarcadores utilizados en el estudio mostraron diferencias significativas entre los tejidos evaluados.

Por su parte, Pérez-Álvarez *et al.*, (2018) reportó que un efluente hospitalario de la Ciudad de Toluca contenía además de fármacos, metales con actividad embriotóxica en *Xenopus Laevis* y *Lithobates catesbeianus*, aunado a alteraciones en el estatus oxidativo. De igual forma Luja-Mondragón *et al.* (2019) reportaron efectos embrionarios letales (CL50) por efluentes hospitalarios en 5.65% y un índice teratogénico de 1.46 en *Cyprinus carpio*.

En el caso particular de la ciudad de Puebla, México, Tenorio-Chávez *et al.*, (2020) informó que el efluente de un hospital privado presentó un índice teratogénico de 2.45% para *D. rerio*. A si mismo informó que la concentración letal del efluente al 50% (LC50) es del 6.1% y la concentración efectiva (EC50) de malformación del 2.5%. El mismo efluente mostró generar diversas malformaciones como; alteraciones del saco vitelino, edema pericárdico, anomalías de eclosión, hipopigmentación, deformación de la cola, malformación de cuerdas, ausencia de aletas, deformación del corion y malformación craneofacial.

Recientemente, Cerro-López *et al.*, (2021) realizó la cuantificación de fármacos presentes en las aguas residuales de hospitales privados pertenecientes a la Ciudad de Puebla encontrando que en aguas con tratamiento se redujo de un 67 al 100% la presencia de naproxeno, ranitidina, hidrocortisona y paracetamol. Esta investigación permitió identificar fármacos que no se habían reportado anteriormente en efluentes hospitalarios de México.

Finalmente, Rosales-Pérez *et al.*, (2022) evaluaron el comportamiento natatorio, estrés oxidativo y la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en *Danio rerio* inducido por un efluente hospitalario de Puebla. Dentro de los principales hallazgos reportados, se encuentra la disminución de la distancia total recorrida y un aumento del tiempo de congelación respecto al grupo control. Además, se encontró una diferencia significativa en lo que respecta a los biomarcadores empleados, tales como; el contenido de hidroperóxidos y el contenido de proteínas carboniladas, en relación con el grupo control y el tiempo de exposición a 96 h. Por último, se reporta una inhibición significativa del neurotransmisor en el cerebro, lo cual tiene como consecuencia alteraciones neuroconductuales.

Cabe señalar que, aunque existen investigaciones en México y particularmente en efluentes de la ciudad de Puebla, en su mayoría no incluyen la implementación de pruebas a nivel molecular como es el caso de la presente propuesta.

Tabla 2. Efectos adversos ocasionados por EH a diferentes concentraciones.

Efecto	Concentración %	Especie	Referencia
MN Cuerpos apoptóticos CL50	1.3 96 h	<i>Clarias gariepinus</i>	(Alimba <i>et al.</i> , 2017)
Fragmentación ADN	25-100 28 días	<i>Mus musculus</i>	(Beltifa <i>et al.</i> , 2019)
CL50 IT 1.46 %	3-6% 96 h	Embriones <i>Cyprinus carpio</i>	(Luja-Mondragón <i>et al.</i> , 2019)
Cito-genotoxicidad	10-60% 96 h	<i>Clarias gariepinus</i>	(Alimba <i>et al.</i> , 2019)
Falta circulación, hipopigmentación etc.,	1-12 96 h	Embriones <i>Danio rerio</i> > <i>Daphnia magna</i> > <i>Aliivibrio fischeri</i>	(Wittlerová <i>et al.</i> , 2020)
Dilatación sinusoidal hepática, necrosis, infiltración leucocitaria	10 21 días	<i>Mus musculus</i>	(Afsa <i>et al.</i> , 2021)
Deterioro de la homeostasis inflamatoria, defensa antioxidante y neurotransmisores	6.25% 48 h	<i>Daphnia magna</i>	(Afsa <i>et al.</i> , 2022)

4.1 Planteamiento del problema

Durante los últimos años, las aguas residuales hospitalarias han aumentado drásticamente debido a la actual pandemia de COVID-19 y al constante desarrollo de los servicios médicos. En los hospitales existen diversas prácticas (radiología, laboratorios químicos y biológicos, cirugías, tratamientos farmacológicos, etc.) las cuales contribuyen a generar una amplia variedad de contaminantes cuya descarga final radica en el alcantarillado municipal o ambientes acuáticos. Estos efluentes al ser una mezcla compleja de contaminantes pueden actuar de forma sinérgica y provocar impactos negativos en los seres vivos. La concentración de los fármacos en los EHs puede oscilar desde el orden de ng-mg/L. Además muchos de estos son compuestos altamente recalcitrantes que impiden su rápida eliminación en las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales (Majumder *et al.*, 2019).

Adicionalmente, un gran número de productos farmacéuticos se consumen en todo el mundo incluso sin prescripción médica, dando como resultado, la contaminación de aguas de hogares y espacios públicos, generando mayores riesgos al medio ambiente y a la salud pública que subyacen sin investigar dado la falta de preocupación al respecto (Santos *et al.*, 2020; Thiebault *et al.*, 2017).

4.2 Justificación

Algunos EHs en México son previamente tratados para su disposición final, sin embargo, la remoción de xenobióticos de este tipo de efluentes por métodos convencionales no se logra del todo, encontrándose en diferentes concentraciones en aguas potables y superficiales (Cerro-López *et al.*, 2021). Dichos xenobióticos tienen la capacidad de alterar el sistema oxidativo de diversos organismos acuáticos, y eventualmente pueden afectar la salud humana.

El número de investigaciones en México respecto a los efectos tóxicos ocasionados por EHs son hasta la fecha aún incipientes, por tal motivo hacer un mayor esfuerzo de investigación permitirá equiparar los avances en países de referencia sobre todo en el marco regulatorio. El presente estudio pretende

evaluar el estrés oxidativo que un EH de la Ciudad de Puebla ejerce sobre *Danio rerio*, tanto a nivel bioquímico como de expresión génica en diferentes órganos diana como son hígado, branquias, intestino y cerebro, en diferentes tiempos de exposición (12 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h) y 4 proporciones (2 %, 2.5 %, 3 % y 3.5 %). Esto permitirá determinar los posibles impactos toxicológicos que el EH podría tener sobre organismos acuáticos.

Los resultados contribuirán a la actualización de la información nacional respecto al daño toxicológico que implican los EHs y servirán de evidencia científica imprescindible para la generación de criterios objetivos que permitan integrar una política ambiental (normas, políticas, procedimientos, etc.) respecto al manejo de aguas residuales hospitalarias. Además, se promoverá la concientización sobre los efectos del consumo de fármacos y su disposición final, así como su impacto a nivel de sociedad, académico y político. En este sentido la investigación contribuye al cumplimiento del objetivo número 6 de los Objetivos del Desarrollo Sostenible, sobre agua limpia y saneamiento, particularmente a la meta 6.3 que establece: “De aquí a 2030, mejorar la calidad del agua reduciendo la contaminación, eliminando el vertimiento y minimizando la emisión de productos químicos y materiales peligrosos, reduciendo a la mitad el porcentaje de aguas residuales sin tratar y aumentando considerablemente el reciclado y la reutilización sin riesgos a nivel mundial” (ONU, 2015). Finalmente, a nivel nacional con respecto a los Programas Nacionales Estratégicos del CONACyt (Pronaces). Los resultados obtenidos en la presente investigación estarían vinculados con el programa de Agentes tóxicos y procesos contaminantes el cual tiene como objetivo sumar esfuerzos y reunir investigadores de diversas disciplinas para generar conocimiento respecto a los procesos celulares/moleculares subyacentes a los efectos adversos producidos por xenobióticos en los organismos vivos y en la estructura y función ecosistémica.

4.3 Pregunta de investigación

¿Qué alteraciones en el estatus oxidativo y expresión génica provocará un efluente hospitalario previamente tratado de la Ciudad de Puebla sobre *Danio rerio*?

4.4 Hipótesis

Debido a que el efluente hospitalario de la Ciudad de Puebla ha mostrado generar daños en el desarrollo embrionario y efectos teratogénicos, se espera que altere el estatus oxidativo y expresión génica en *Danio rerio*.

4.5 Objetivo general

Evaluar el estrés oxidativo y la expresión génica inducidos por un efluente hospitalario de la Ciudad de Puebla sobre *Danio rerio*.

4.5.1 Objetivos específicos

Determinar los biomarcadores de oxidación celular inducidos por la exposición a un efluente hospitalario en adultos de *Danio rerio*.

Determinar los biomarcadores de antioxidación inducidos por la exposición a un efluente hospitalario en adultos de *Danio rerio*.

Evaluar la expresión de genes de estrés oxidativo inducidos por la exposición a un efluente hospitalario en adultos de *Danio rerio*.

Evaluar la expresión de genes de apoptosis inducidos por la exposición a un efluente hospitalario en adultos de *Danio rerio*.

5. Marco metodológico

5.1 Sitio de muestreo y recolección del EH

Se recolectaron muestras de un EH previamente tratadas por una PTAR del hospital Beneficencia Española (HBE) ubicada en la Ciudad de Puebla, México (Figura 8). El HBE es un hospital general de tamaño grande, con aproximadamente 500 camas, cuenta con una vasta variedad de especialidades médicas (p. ej. Oncología, cardiología, radiología, entre otras más). Las muestras fueron colectadas como se estipula en la norma Mexicana NMX-AA-003-1980, en enero de 2022, durante los periodos de mayor actividad laboral (8:00 am - 11:00 am). La muestra fue resguardada en un frasco ámbar de 10 L de capacidad previamente esterilizados y lavados con solución de ácido nítrico al 30 % y agua desionizada, posteriormente se almacenó a 4 °C hasta su análisis. Se seleccionó el EH del HBE por hallazgos previos de alteraciones embrionarias en larvas de *D. rerio* (Rosales-Pérez *et al.*, 2022).

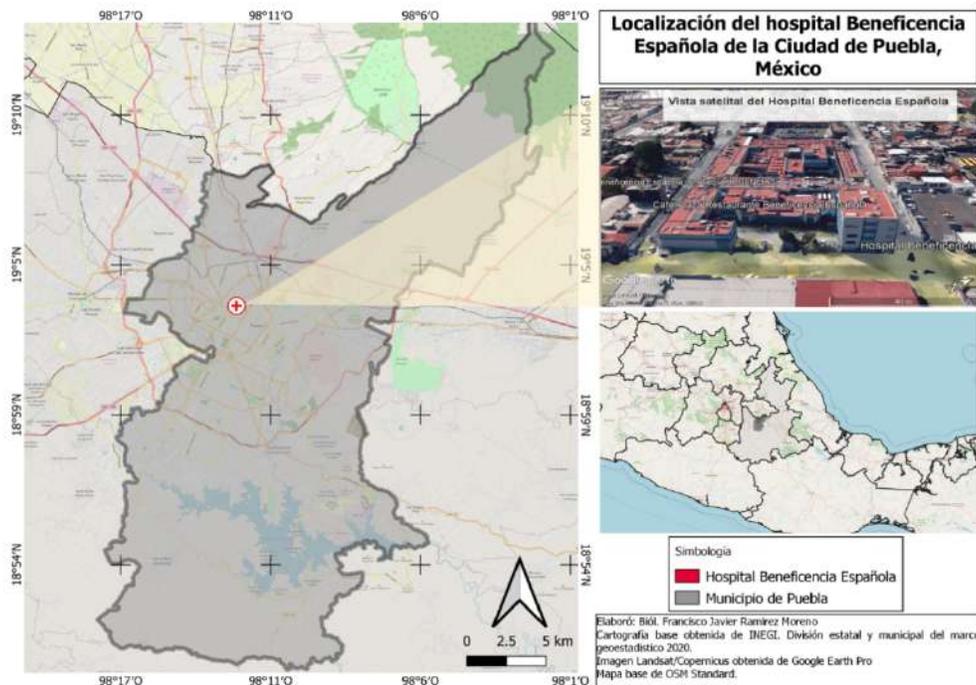


Figura 8. Localización del Hospital Beneficencia Española de la Ciudad de Puebla, México.

Se resume a continuación el proceso de la PTAR del BEH. El influente hospitalario que proviene de las diferentes especialidades es dirigido hacia la PTAR en donde se separan materiales y sólidos que no pueden ser procesados biológicamente. El biorreactor de la PTAR es constantemente aireado, el agua ingresa a un clarificador secundario para hacer sedimentar o remover las partículas suspendidas y se decanta el lodo activo (LA). El LA tiene que estabilizarse para después ser deshidratado en lechos de secado. Por otro lado, el sobrenadante ingresa a la unidad de desinfección en donde se agrega hipoclorito de sodio (NaClO). Finalmente el agua tratada es transportada por un canal de tipo Parshall hacia el alcantarillado municipal.

5.2 Esquema metodológico

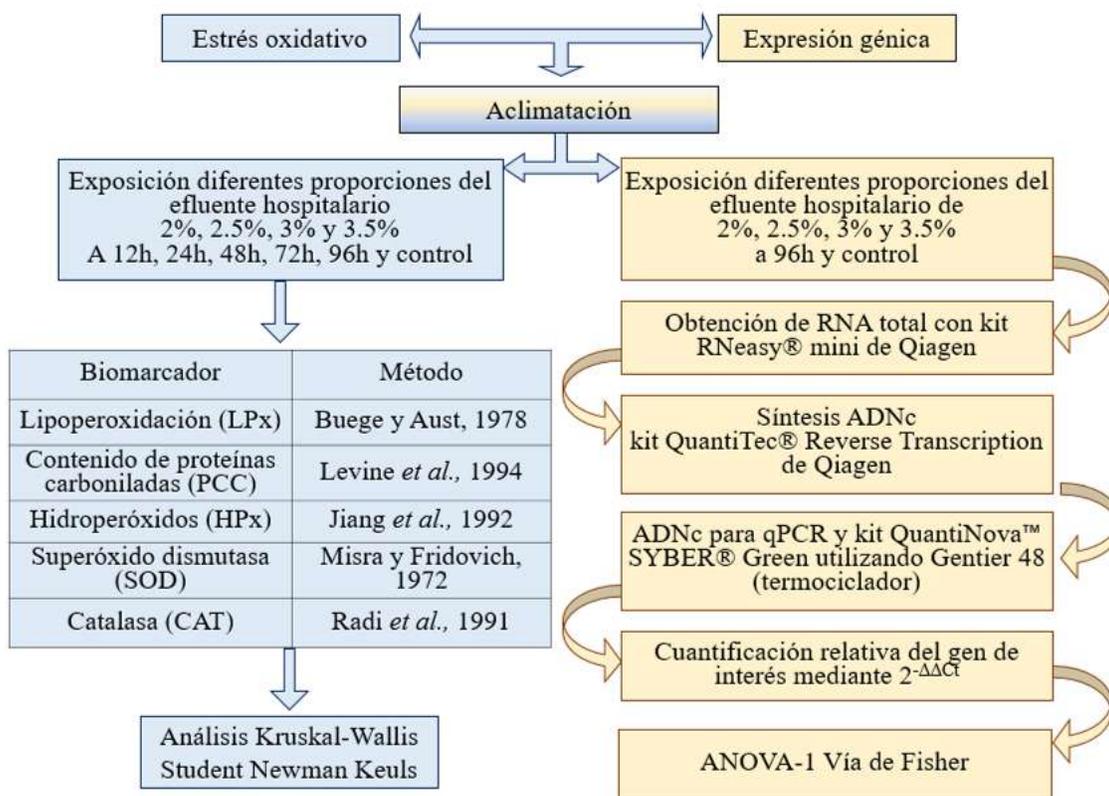


Figura 9. Esquema metodológico.

5.3 Mantenimiento de organismos prueba (*Danio rerio*)

Los adultos de *D. rerio* de tipo silvestre (AB) de 7 meses de edad (1.27 ± 0.4 g en peso y 4.11 ± 0.09 cm en longitud) se conservaron en peceras con una capacidad de carga de 1 L/pez, con fotoperiodo natural de 12:12, oxigenación continua de 9.8 ± 0.5 mg/L, pH de 7.4, temperatura de 27 ° C y una alimentación de dos veces al día con hojuelas comerciales (Ocean Nutrition, US) y *Artemia spp.*, por un tiempo de aclimatación de tres meses. Se monitoreo y controló varios parámetros de calidad del agua durante todo el experimento. El agua se removía cada segundo día con la finalidad de mantener bajo el contenido de nitratos (2.6 ± 0.2 mg/L) y nitritos (0.028 ± 0.007 mg/L). Se agregó 1 gota de anticloro por cada 2 litros de agua y sales de Instant Ocean® (9 mg/L). Finalmente, se seleccionaron aquellos organismos que oscilaban entre 3 y 4.2 cm de longitud, libres de infección y síntomas de enfermedad (Gómez-Oliván *et al.*, 2017).

5.4 Diseño experimental para evaluar el estrés oxidativo

Se emplearon 20 sistemas de 10 L de capacidad con las siguientes proporciones del EH: 2 %, 2.5 % , 3 %, 3.5 % y un control, libre de EH. Se empleó una prueba de toxicidad de renovación semiestática con remoción periódica (24 h) (OECD, 2019). Los parámetros del agua se mantuvieron constantes. Para disminuir el sesgo experimental, se ocuparon peces machos para prevenir las posibles alteraciones en los niveles hormonales asociados al desove. Las proporciones se seleccionaron con base a estudios previos realizados en el laboratorio (Rosales-Pérez *et al.*, 2022; Tenorio-Chávez *et al.*, 2020). Los tiempos de exposición fueron de 12 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h. Para todas las pruebas los peces fueron sacrificados mediante el método de choque hipotérmico (2 °C – 4 °C). Se obtuvo un pool de branquias, cerebros, intestinos e hígados de seis organismos para cada sistema y fueron almacenados en tubos Eppendorf, previamente llenados con 1.2 mL de solución tampón de fosfato (PBS, pH 7.4). Los tubos se congelaron a -80 °C hasta su uso. El experimento de estrés oxidativo se realizó por triplicado y a su vez cada pool de órganos se analizó 3 veces. Se utilizaron un total de 378 organismos de *D. rerio*. Se obtuvieron 9 resultados para cada biomarcador, que

posteriormente se emplearon para realizar los análisis estadísticos correspondientes (n = 9).

5.4.1 Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo

El pool de órganos ($\approx 528 \mu\text{g}$) de *D. rerio* se homogeneizó en 1 mL de buffer de fosfatos (PBS, 7.4) durante 20-40 s utilizando un rotor estator (Ultra-turrax T25, IKA, Alemania) a 10 000 rpm. Posteriormente, las muestras se dividieron en dos tubos Eppendorf. El tubo 1 contenía 300 μL del homogeneizado más 300 μL de una solución de ácido tricloroacético (ATC) al 20%. El tubo 2 contenía 700 μL del homogeneizado. El tubo 1 fue centrifugado a 11495 rpm durante 15 min a 4 °C y el precipitado se utilizó para determinar el contenido de carbonilo proteico (PCC), mientras que el sobrenadante fue examinado para establecer el grado de lipoperoxidación (LPX) y el contenido de hidroperóxido (HPC). El tubo 2 se centrifugó a 12 500 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT). Los biomarcadores de daño oxidativo y la actividad de las enzimas antioxidantes serán determinados por diferentes métodos (Tabla 3).

Tabla 3. Métodos utilizados para la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo.

	Biomarcador	Método implementado
Tubo 1	LPX	Buege y Aust, 1978
	PCC	Levine <i>et al.</i> , 1994
	HPC	Jiang <i>et al.</i> , 1992
Tubo 2	SOD	Misra y Fridovich, 1972
	CAT	Radi <i>et al.</i> , 1991

5.4.2 Determinación de la lipoperoxidación

El LPX será determinada mediante el método de Buege y Aust (1979). Del tubo 1 se tomó 50 μL del sobrenadante, posteriormente se agregó 450 μL de solución Tris-HCL 150 mM y 1 mL de solución ATC-TBA en tubos de vidrio. A continuación,

fueron sumergidos en agua en ebullición para producir el coque térmico. Se colocaron los tubos en la incubadora por 30 minutos a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a retirar los tubos y centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos. Se leyó la absorbancia de las muestras a 535 nm contra un blanco que contenga buffer de fosfatos (PBS) de 1 M y pH de 7.4 y el mismo tratamiento que las muestras. El contenido de MDA fue calculado usando el coeficiente de extinción molar (CEM) de 1.56×10^5 / M / cm. Los resultados se expresaron como M malondialdehído (MDA) / mg de proteína.

5.4.3 Determinación del contenido de carbonilo proteico

El PCC se determinó utilizando el método de Levine et al. (1994). Del tubo 1 se utilizó el precipitado y se agregó 150 μ L de dinitrofenilhidracina (DNPH 1 M / HCL 2 M), se dejó reposar los tubos 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se adicionó 500 μ L de ATC al 20 %, se dejó reposar los tubos 15 minutos a 4 °C, posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 11000 rpm, se descartó el sobrenadante, se lavó el botón con una solución de etanol: acetato de etilo 1:1 cuantas veces fue necesario hasta obtener un botón blanco, a continuación se disolvió en 1 mL de Guanidina 6 M y se incubó los tubos a 37 °C por 30 minutos. Finalmente, se leyó la absorbancia a 366 nm utilizando un blanco con 200 μ L de PBS que tuvo el mismo tratamiento que las muestras. El contenido de carbonilos reactivos fue calculado usando el coeficiente de extinción molar (CEM) de 21 000 / M / cm. Los resultados se expresaron como carbonilos reactivos μ M (C= O) formados / mg de proteína.

5.4.4 Evaluación del contenido de hidroperóxido

Del tubo 1, se tomó 100 μ L de sobrenadante y se agregó 900 μ L de la mezcla de reacción (FeSO₄, H₂SO₄ y Butilato deshidroxitolueno, Anaranjado de xilenol) en un tubo eppendorf, se dejó reposar los tubos por 60 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz, pasando este tiempo se procedió a leer la absorbancia a 560 nm utilizando un blanco que tuvo PBS y el mismo tratamiento que las

muestras. Los resultados fueron interpolados en una curva patrón y se reportan como nM de hidroperóxido (HPx) / mg de proteína.

5.4.5 Determinación de la actividad superóxido dismutasa

La actividad de SOD fue determinada mediante el método de Misra y Fridovich (1972). Se tomó 40 μ L de sobrenadante del tubo 2 y se colocó directamente en la celda, a continuación, se adicionó 260 μ L de solución amortiguadora de carbonato (50 mM Na_2CO_3 , 0.1 mM EDTA) y 200 μ L de adrenalina 30 mM. Finalmente, la absorbancia fue leída a 480 nm (a los 30 segundos y 5 minutos) utilizando un blanco de PBS que tuvo el mismo tratamiento que las muestras. Los resultados fueron interpolados en una curva patrón de Cu/Zn SOD bovina y se reportan como UI/SOD/mg de proteína.

5.4.6 Determinación de la actividad catalasa

La actividad CAT fue determinada por el método Radi et al. (1991). Se tomaron 30 μ L de sobrenadante del tubo 2 y se colocó directamente en la celda, se adicionó 420 μ L de buffer de aislamiento (0.3 M sacarosa, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4) y 300 μ L de una solución de peróxido de hidrogeno 20 mM. Finalmente, la absorbancia fue leída a 240 nm utilizando un blanco de PBS que tuvo el mismo tratamiento que las muestras. Los valores se obtuvieron sustituyendo el valor de absorbancia obtenido para cada uno de estos tiempos en la fórmula: concentración de CAT = $(A_0 - A_{60}) / \text{MEC}$). El CEM del H_2O_2 es 0.043 mM/cm. Los resultados se expresan como $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ de proteína.

5.4.7 Determinación del contenido de proteína total

Del tubo 2 se tomó 13 μ L de sobrenadante y se depositó en un tubo de plástico, posteriormente se agregó 75 μ L de agua destilada y 1.25 mL del reactivo de Bradford, los tubos se agitaron y se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Finalmente, se leyó la absorbancia a 595 nm, se utilizó un blanco de PBS que tuvo el mismo tratamiento que las muestras, las absorbancias obtenidas fueron extrapoladas a una curva patrón para conocer la

concentración de proteínas totales. Todos los resultados de los biomarcadores se normalizaron frente a las proteínas totales, que se midieron mediante el método de Bradford, 1976.

5.5 Diseño experimental para evaluar la expresión génica

Se utilizaron 4 sistemas con 10 L de capacidad con las proporciones del EH (2 %, 2.5 %, 3 % y 3.5%) y un control. Para este análisis el tiempo de exposición se fijó en 96 h. Se obtuvieron las muestras correspondientes (pool de órganos) y fueron almacenadas en una solución estabilizadora de RNAlater®, Qiagen. En total se emplearon 90 organismos para las 3 réplicas.

El ARN total se obtuvo con el kit RNeasy® mini kit de Qiagen. El pool de órganos fue homogeneizado durante 20-40s en 600 µL de solución RLT que contenía β-mercaptoetanol para evitar contaminación proteica del ARN. Posteriormente se centrifugó el lisado por 3 min a velocidad máxima. El sobrenadante fue removido por pipeteo y transferido a un nuevo tubo donde se agregó un volumen de etanol al 70% y 50 % para el caso del hígado para mejorar el rendimiento de extracción. Cabe señalar que todos los pasos de centrifugación se realizaron a 20°C. A continuación se transfirió 700 µL de la muestra incluyendo cualquier precipitado hacia una columna spin de RNeasy montada sobre un tubo de recolección de 2 mL, se centrifugó a 10 000 rpm por 15s y se desechó el flujo continuo. Después se agregó 700 µL de buffer RW1 y centrifugó a 10 000 rpm por 15s, se descartó el flujo. Se añadió 700 µL de buffer RPE y se repitió el paso anterior. Consecutivamente se volvió a lavar la membrana con 500 µL de RPE y se centrifugó por 2 min a 10 000 rpm. Finalmente, la columna spin de RNeasy se trasladó a un tubo de recolecta de 1.5 mL, se agregó 50 µL de agua libre de ARNsas directamente en la membrana y se centrifugó por 1 min a 10 000 rpm para obtener el eluido de ARN. Posterior al aislamiento del ARN se evaluó la calidad de este por espectrofotometría en un NanoDrop mediante la relación de absorbancia 260/280 nm para descartar contaminación proteica y 260/230 nm para compuestos orgánicos El cociente de estas absorbancias osciló entre 1.9 a 2.2.

Para la obtención del ADNc se empleó el Kit QuantiTec® Reverse Transcription. En primera instancia se preparó la reacción de eliminación del ADN genómico que podría acarrear el ARN. Se utilizó 2 μL del buffer gDNA Wipeout, 3 μL del ARN a una concentración $\approx 1 \mu\text{g}$, y 9 μL de agua libre de ARNsas. Se incubó por 2 min a 42 °C. Posteriormente se preparó la Máster Mix para la retrotranscripción que contuvo 1 μL de Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 μL de buffer Quantiscript RT, 1 μL de RT Primer Mix y el volumen de reacción de eliminación de ADN genómico preparado con anterioridad (14 μL). Finalmente, se incubó por 15 min a 42 °C seguido de 3 min a 95 °C para inactivar la enzima retrotranscriptasa. Se utilizó el ADNc como plantilla para la qPCR y el kit QuantiNova™ SYBR® Green para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se empleó el termociclador Gentier 48 (Xi'an Tianlong) para llevar a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real. El volumen total de reacción fue de 20 μL , 10 μL de 2x QuantiNova SYBR Green PCR Máster Mix, 2 μL de tinte de referencia ROX (dilución 1/10), 1.5 μL de cebadores Forward y Reverse a una concentración 0.7 μM , 3 μL de agua libre de ARNsas y 2 μL de ADNc ($\leq 100 \text{ ng/ reacción}$). La metodología consistió en un paso inicial de activación de la DNA polimerasa durante 2 min a 95°C, seguido de 37 ciclos que incluyen el paso de desnaturalización durante 5s a 95°C y un paso que combina el alineamiento y extensión de los cebadores durante 10s a 60°C. Cabe señalar que las T_m de los cebadores es $\leq 60^\circ\text{C}$. La cuantificación relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de cada nivel de expresión génica se normalizó de acuerdo con la expresión del gen β -Actina (Housekeeping). Los cebadores utilizados se enlistan en la Tabla 4. Estos fueron diseñados y adquiridos comercialmente por el equipo de trabajo del laboratorio, previo a la planificación experimental del presente trabajo.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos.

Gen	Número de acceso	Forward primer	Reverse primer	Referencia
<i>sod</i>	Y12236.1	AAG AAG CCA GTG AAG GTG ACT	ACA TTA CCC AGG TCT CCG AC	Liu <i>et al.</i> , 2013
<i>cat</i>	AF170069.1	AGA TGA AAC TGT GGA AGG AGG GTC	AAA CAC TTT GGC TTT GGA GTA GCG	Liu <i>et al.</i> , 2013
<i>nrf2</i>	NP_878309	ACC CAA TAG ATC TAC AGA GC	GGT GTT TGG ACA TCA TCT CG	Sant <i>et al.</i> , 2017
<i>bax</i>	AF231015	GGC TAT TTC AAC CAG GGT TCC	TGC GAA TCA CCA ATG CTG T	Cheng <i>et al.</i> , 2020
<i>casp6</i>	NM001020497.1	AGG ACA GCG CTT CAG CAG GAC A	TGA GAG CCA TTC CCC GTC TCT TGT	Félix <i>et al.</i> , 2018
<i>casp9</i>	NM_001007404.2	CGG AGG AGG TGA GAA GGA TAT	TCC AGC ACA CGA TCA AGA TT	Jiang <i>et al.</i> , 2014
<i>cyp1a1</i>	AF210727.2	CGCTTGATGGGCTTGTCCT	CGCAGCTAAAACAGGCACTC	Chen <i>et al.</i> , 2018
<i>β-actina</i>	NM_181601.4	ACT GTA TTG TCT GGT GGT AC	TAC TCC TGC TTG CTA ATC C	Soares <i>et al.</i> , 2009

5.6 Análisis metataxonómico del EH

5.6.1 Extracción del ADN metagenómico

Se filtró 1L de EH con la ayuda de una bomba de vacío conectada al kit KG47 Glass Support kit (Advantec MFS, Inc.) y se capturó la biomasa suspendida empleando una membrana de 0.2 µm. Se utilizó la membrana para la extracción de ADN metagenómico utilizando el kit ZymoBIOMICS® DNA Miniprep y se siguió el protocolo del fabricante, posteriormente se revisó la integridad del ADN metagenómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% empleando el marcador molecular Lambda/Hind III. La pureza y concentración del ADN en las muestras se analizaron con espectrofotómetro y las muestras se almacenaron a -80 ° C. Se amplificó las regiones V3-V4 del gen 16S ARNr (IMR; <http://cgeb-imr.ca>), mediante PCR utilizando los cebadores 341F y 805R. El tamaño de los amplicones se comprobarán por medio de la electroforesis en gel de agarosa 1% empleando el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder, para analizar y confirmar que las muestras extraídas contuvieran material genético.

5.6.2 Análisis de las secuencias.

El ADN fue secuenciado en una plataforma de MiSeq System – Illumina en Canada. La secuenciación de alto rendimiento del gen bacteriano 16S ARNr se realizó utilizando el conjunto de cebadores 341F y 805R (Klindworth *et al.*, 2013). El análisis de las secuencias se realizó a través del programa mothur v.1.48.0

(Kozich *et al.*, 2013). En primera instancia se eliminaron aquellas secuencias que tuvieran un error originado por la preparación de librerías o secuenciación, con las secuencias restantes se realizaron los contigs correspondientes y se procedió a alinearlas con secuencias de referencia bacterianas del gen 16S ARNr (<https://www.arb-silva.de/>), se estableció una longitud máxima de 8 homopolímeros y 0 ambigüedades. A continuación, se removieron aquellas secuencias quiméricas para posteriormente realizar la asignación taxonómica de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) el cual se obtuvo por la alineación con el clasificador taxonómico RDP con identidades $\geq 95\%$. Los taxones eucariotas y arqueas se excluyeron empleando el filtro de taxones de mothur. Se calculó la diversidad α y β de las 2 muestras procedentes del mismo EH, designadas como HB1 y HB2. Finalmente, se representa en gráficos Krona la composición bacteriana del EH.

5.7 Ubicación filogenética de secuencias aminoacídicas SOD y CAT

Derivado de los resultados obtenidos de actividad antioxidante Cu/Zn-SOD y CAT en *D. rerio* y a la evidencia científica referente a disminuciones de la actividad catalítica de estas enzimas en diferentes grupos biológicos expuestos a contaminantes, se planteó la hipótesis de que las secuencias aminoacídicas de *D. rerio* podrían poseer mayor similitud filogenética con grupos biológicos en los cuales son más usuales los reportes científicos sobre inhibición o decrementos de la actividad Cu/Zn-SOD y CAT. Las secuencias utilizadas se resumen en la Tabla 5 junto con sus números de acceso del GeneBank obtenidos de la base de datos NCBI. Se alinearon mediante el método muscle, porciones completas o parciales de las secuencias proteicas de SOD y CAT de diferentes especies pertenecientes a 3 grupos biológicos; Anfibios; *Xenopus laevis*, *Lithobates catesbeianus*, Peces; *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, crustáceos; *Hyalomma azteca* y *Daphnia magna*, empleando el programa SeaView (Gouy *et al.*, 2010).

Posteriormente, las alineaciones se mejoraron manualmente mediante un rasurado de los extremos de tal forma que se hicieran coincidir la mayor extensión de secuencias aminoacídicas posibles. Los alineamientos aminoacídicos finalmente se analizaron con el programa MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) para inferir las relaciones evolutivas existentes entre las proteínas Cu/Zn-SOD y CAT. Los árboles filogenéticos se construyeron con el método de neighbor joining (Saitou y Nei, 1987), utilizando tanto el modelo de Jones-Taylor-Thornton y de máxima verosimilitud para calcular las distancias filogenéticas (Fitch, 1971). La robustez de las topologías de los árboles se probó mediante la prueba no paramétrica de bootstrap (Felsenstein, 1985). Se realizaron mil repeticiones para el análisis.

Tabla 5. Especies empleadas para elaboración de árbol filogenético.

Cu/Zn SOD Especie	Número de acceso	CAT Especie	Número de acceso
<i>D. rerio</i>	Y12236.1	<i>D. rerio</i>	>NP_570987.2
<i>C. carpio</i>	AF170069.1	<i>C. carpio</i>	>XP_04260853 1.1
<i>X. laevis</i>	NP_878309	<i>X. laevis</i>	>XP_04144577 3.1
<i>L. catesbeianus</i>	AF231015	<i>L. catesbeianus</i>	>ADD17090.1
<i>H. azteca</i>	NM001020497. 1	<i>H. azteca</i>	>XP_01801647 5.1
<i>D. magna</i>	NM_001007404 .2	<i>D. magna</i>	>ACU81116.1
<i>D. rerio</i>	AF210727.2	<i>D. rerio</i>	>NP_570987.2

5.8 Análisis estadísticos

Se utilizó el software Sigma Plot 12.3 para el análisis estadístico. Los datos de estrés oxidativo fueron evaluados mediante un ANOVA no paramétrica de una vía de Kruskal-Wallis, seguido de una prueba post hoc (Student Newman Keuls) y se expresaron como la mediana \pm Rango intercuartílico (R). Para determinar las diferencias significativas en la expresión génica entre los grupos de tratamiento y el grupo de control, se realizó una ANOVA-1 de Fisher seguido de una prueba de Student Newman Keuls (SNK) considerando una significancia estadística de $p < 0.05$. Posteriormente, se construyó un mapa de calor usando el paquete “pheatmap” del software R Studio (Kolde, 2019).

6. Resultados

6.1 Caracterización fisicoquímica del EH

La Tabla 6 lista la caracterización fisicoquímica del EH y se contrasta con lo establecido en las normas oficiales de descargas de aguas residuales en bienes nacionales (NOM-001-SEMARNAT-1996) y sistema de alcantarillado urbano-municipal (NOM-002-SEMARNAT-1996). Se observó que los cloruros, fluoruros y los sólidos suspendidos totales (SST) sobrepasan los límites máximos permisibles. Además la conductividad ($347.2 \mu\text{S cm}^{-1}$), NaClO (6.9 mg L^{-1}), oxígeno disuelto (4.7 mg L^{-1}) y amoníaco (2.3 mg L^{-1}) no son considerados en ninguna de las normas.

Tabla 6. Caracterización físico-química del efluente hospitalario de la Ciudad de Puebla. N.E, No establecida en la norma.

Parámetros fisicoquímicos	Efluente hospitalario	NOM-001-SEMARNAT-1996	NOM-002-SEMARNAT-1996
DBO (mg/L)	92.8 ± 1.5	60	40-60
DQO (mg/L)	190.2 ± 2.7	N.E	N.E
Conductividad $\mu\text{S/cm}$	347.2 ± 9.4	N.E	N.E
pH (UpH)	5.7 ± 0.1	6.5-8.5	6-9
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	22 ± 1	35	40
Oxígeno disuelto (mg/L)	4.7 ± 0.92	N.E	N.E
Cloruros (mg/L)	284.3 ± 4.8	250	N.E
Fluoruros (mg/L)	28.22 ± 0.4	0-15	N.E
Dureza (mg/L)	141.4 ± 3.2	500	N.E
Amoniaco (mg/L)	2.3 ± 0.4	N.E	N.E
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	101.2 ± 2.3	40	40-60
Fósforo total (mg/L)	7.6 ± 0.27	10	10
Nitrógeno total (mg/L)	19.62 ± 1.3	25	N.E
NaClO (mg/L)	6.9 ± 0.74	N.E	N.E

6.2 Caracterización de contaminantes del EH

Se identificaron diferentes metales pesados por encima de la normatividad mexicana (Tabla 7). Por otro lado, a pesar de que no existen límites máximos establecidos para los fármacos, la ranitidina y el ketorolaco tenían las concentraciones más altas encontradas en los efluentes hospitalarios. Cabe destacar que, a pesar de que el uso de ranitidina ha sido restringido debido al posible riesgo carcinogénico, fue el fármaco con mayor concentración en el EH. Además, se detectaron varios fármacos cuya concentración oscilaba entre 11 ng/L y 19.1 µg/L. Los resultados son coherentes con la gran diversidad de especialidades del HBE; en este sentido, el grupo farmacéutico más representativo corresponde a antiinflamatorios no esteroideos (AINES), que suelen prescribirse junto con inhibidores de la bomba de protones para contrarrestar los efectos secundarios producidos por los AINE con propiedades ácidas.

Tabla 7. Contaminantes detectados en el efluente hospitalario de la Ciudad de Puebla. Se muestran con * los datos que superan los valores establecidos por la normatividad mexicana.

Tipo de contaminante	Metal o droga	Concentración
Metales	As (mg/L)	0.42 ± 0.06 *
	Cd (mg/L)	0.39 ± 0.02 *
	Cu (mg/L)	0.67 ± 0.09
	Cr (mg/L)	0.87 ± 0.06
	Hg (mg/L)	1.62 ± 0.07 *
	Ni (mg/L)	1.46 ± 0.05
	Pb (mg/L)	2.11 ± 0.03 *
	Zn (mg/L)	1.36 ± 0.07
AINES	Ketorolaco (ng/L)	1784.3 ± 5.2
	Ibuprofeno (ng/L)	338 ± 1.1
	Naproxeno (ng/L)	691.7 ± 3.8
	Paracetamol (ng/L)	519.61 ± 2.7
Corticoesteroides	Dexametasona (ng/L)	272.12 ± 0.71
	Hidrocloruro de Hidrocortisona (ng/L)	32.13 ± 0.14
Inhibidores de la bomba de protones	Esomeprazol (ng/L)	12.43 ± 0.14
	Omeprazol (ng/L)	11 ± 0.12
H2-antagonista	Ranitidina (µg/L)	19.1 ± 0.87

6.3 Caracterización metataxonómica del EH

La tabla 8 muestra los índices de diversidad obtenidos para las 2 muestras de EH. El número de secuencias procesadas fue de 8408 y los OTUs reportados para la muestra HB1 y HB2 fueron 268 y 430, respectivamente. Los valores de cobertura de las muestras (0.99 y 0.98) indican una buena profundidad de secuenciación y caracterización. La muestra HB2 tuvo la mayor diversidad bacteriana. La diversidad β de Whittaker (0.3), indica que se logró caracterizar $\approx 70\%$ de las comunidades bacterianas presentes en el HE.

Tabla 8. Índices de diversidad bacteriana de las muestras HB1 y HB2 procedentes del EH.

Muestra	#Seqs	Cobertura	OTUs	Inv-simpson (lci-hci)	Chao (lci-hci)	Shannon (lci-hci)	β Whittaker
HB1	8408	0.99	268	4.24 (4.1-4.39)	506.39 (411.85-663.38)	2.58 (2.53-2.63)	0.3
HB2	8408	0.98	430	24.14 (23.02-25.37)	665.49 (586.77-783.74)	4.17 (4.13-4.21)	

La Figura 10 muestra el esfuerzo de secuenciación para la muestra HB1 y HB2. En la muestra HB2 sería necesario realizar un mayor esfuerzo de secuenciación para lograr una cobertura más amplia de las comunidades bacterianas, caso contrario para la muestra HB1.



Figura 10. Curva de rarefacción del esfuerzo de secuenciación de las regiones V3-V4 del Gen 16S ARNr.

Las figuras 11 y 12 muestran la caracterización metataxonómica de la muestra HB1 y HB2 procedentes del EH. Los resultados bioinformáticos permitieron obtener el género bacteriano, sin embargo, los gráficos Krona se presentan al nivel taxonómico de orden para tener una mejor visualización. Se identificó un total de 94 géneros bacterianos. Los géneros con abundancia relativa >1% en HB1 y HB2 incluyen *Aquicella* (57.15 y 7.39 %, respectivamente), *Clostridium XI* (2.39%, HB2), *Clostridium sensu stricto* (5.89, HB2), *Parachlamydia* (1.55 y 32.36%), *Pseudomonas* (17.07, HB2), *Legionella* (28.14 y 6.14%), *Gemmatimonas* (1.72 y 4.77%), *Mycobacterium* (1.62%, HB2), *Dongia* (1.62 y 4.26%), *Hyphomicrobium* (1.34, HB2), *Nannocystis* (1.99%, HB2), *Nitrosospira* (1.19, HB2), *Nitrospira* (1.10, HB2), *Pseudolabrys* (1.6 y 4.52%), *Opitutus* (1.54%, HB1). Resalta la presencia de bacterias oportunistas como *Legionella*, *Pseudomonas*, *Clostridium XI*, *Parachlamydia* y *Mycobacterium*.

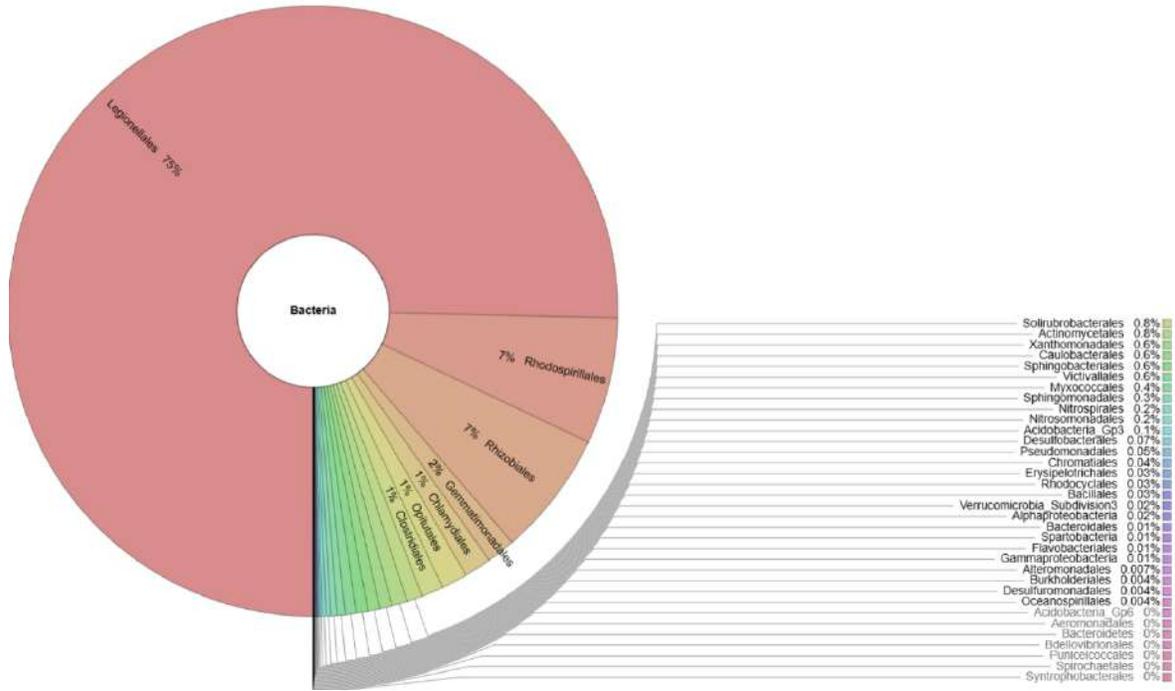


Figura 11. Caracterización metataxonomica de la muestra HB1 procedente del EH.



Figura 12. Caracterización metataxonomica de la muestra HB2 procedente del EH.

6.4 Biomarcadores de estrés oxidativo en hígado, intestino, cerebro y branquias

La LPX expresada como concentración de Malondialdehído (MDA) mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos con respecto al grupo control (Figura 13). En hígado, los niveles más altos ($H(20) = 203.52$, $p < 0.001$) se obtuvieron a las 72 h a la proporción del 3 % (512%) y 3.5 % (480%). En intestino ($H(20) = 189.36$, $p < 0.001$) a las 12 h a la proporción del 3.5 % (700%). En cerebro ($H(20) = 204.63$, $p < 0.001$) entre las 72 h-96 h se reporta la mayor concentración de MDA a la proporción del 3.5 % (569 y 580%, respectivamente). Por último, las branquias ($H(20) = 198.81$, $p < 0.001$) presentan un aumento de forma dependiente a la proporción EH y tiempo de exposición, alcanzando la mayor concentración de MDA a las 96 h a la proporción del 3 % (774%).

La cuantificación de HPC mostró diferencias significativas en los tratamientos comparados con el grupo control (Figura 14). En hígado se reporta el nivel más alto ($H(20) = 203.54$, $p < 0.001$) a las 72 h a la proporción del 3% (1131%). En intestino ($H(20) = 203.84$, $p < 0.001$) a las 12 h a la proporción del 3 % (886%) En cerebro ($H(20) = 203.27$, $p < 0.001$) a las 72 h a la proporción del 3.5 % (697%). En branquias ($H(20) = 197.85$, $p < 0.001$) a las 96 h a la proporción del 3 % (436%), no obstante es de remarcar su patrón, ya que existe una mayor concentración de HPC a tiempos de exposición tempranos (12 h) y prolongados (96 h) que a tiempos intermedios (24-48 h).

La Figura 15 muestra la concentración de PCC. Se encontraron diferencias significativas en los tratamientos respecto al grupo control. El nivel más alto en hígado ($H(20) = 203.43$, $p < 0.001$) se encontró a las 72 h a la proporción del 3.5 % (501%). En intestino ($H(20) = 203.28$, $p < 0.001$) a las 48 h a la proporción del 3.5 % (876%). En cerebro ($H(20) = 205.87$, $p < 0.001$) y branquias ($H(20) = 203.06$, $p < 0.001$) a las 72 h a la proporción del 3.5 % (757 y 553%, respectivamente).

En hígado la mayor actividad SOD ($H(20) = 206.3; p < 0.001$) se observó a las 24 h a la proporción de 3.5 % (473%) (Figura 16). En el intestino ($H(20) = 203.05; p < 0.001$) a las 48 h a la proporción del 3.5 % (253%). En cerebro ($H(20) = 196.69; p < 0.001$) a las 48 h a la proporción del 3.5 % (129%). Cabe señalar que, en cerebro la respuesta antioxidante permanece similar entre las 12-48 h a las diferentes proporciones del EH. De todos los órganos evaluados, las branquias mostraron la mayor actividad SOD ($H(20) = 194.89; p < 0.001$) a las 24 h a la proporción del 3 % (309%). Finalmente, en todos los órganos resalta la disminución catalítica de SOD a mayores tiempos de exposición (72 h y 96 h).

Respecto a la actividad CAT, el mayor incremento con respecto al grupo control se observó a las 72 h a la proporción del 3% (793%) y 3.5 % (770%) ($H(20) = 205.74, p = < 0.001$) (Figura 17). En intestino ($H(20) = 188.46, p = < 0.001$) y cerebro ($H(20) = 204.23, p = < 0.001$) se aprecia una mayor actividad CAT a las 48 h a la proporción del 3.5 % (870 y 680%, respectivamente). Referente a las branquias ($H(20) = 196.9, p = < 0.001$) a las 12 h a la proporción del 3 % (430%). En branquias es de denotar el aumento catalítico en todos los tiempos de exposición, excepto a las 48 h y 96 h en donde existe un ligero decremento con respecto al tiempo de exposición anterior inmediato (24 h y 72 h, respectivamente).

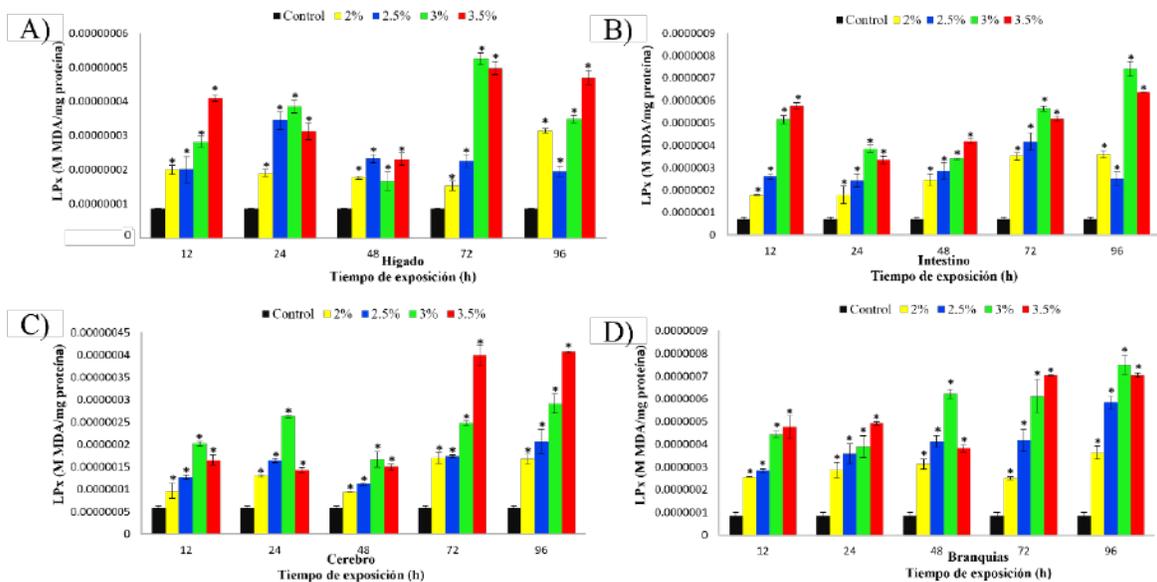


Figura 13. Lipoperoxidación (LPX) en Hígado A, Intestino B, Cerebro C, Branquias D en *D. rerio* expuesto a 4 proporciones de un EH por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la mediana \pm Rango intercuartílico, n= 9. * Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). N= 378 peces.

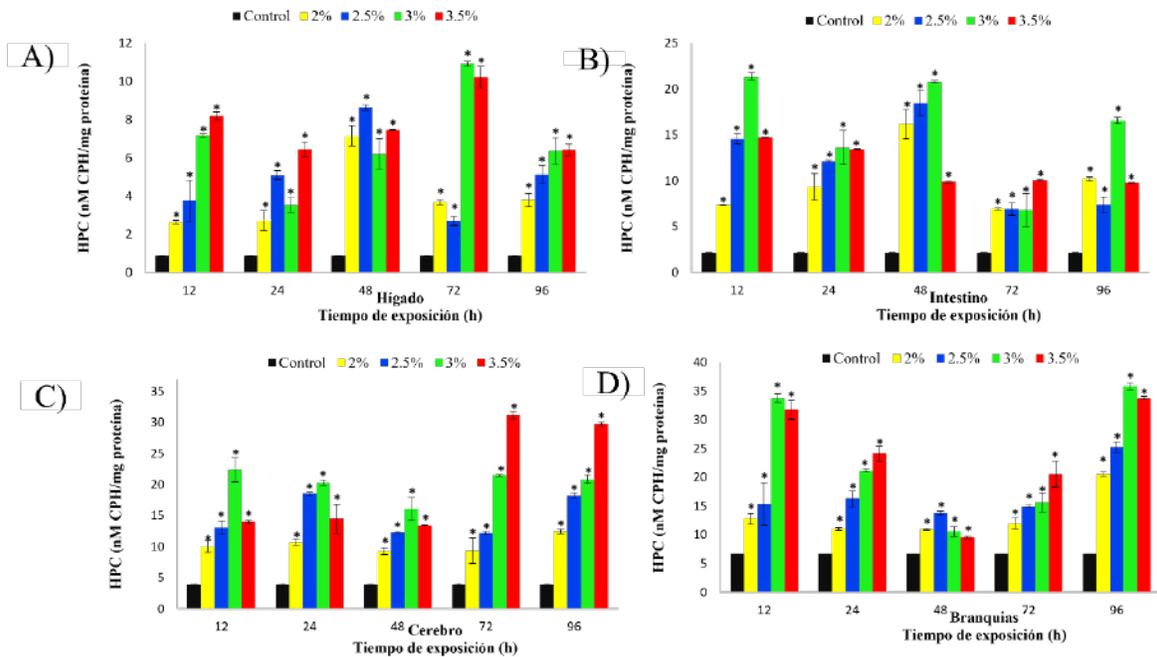


Figura 14. Contenido de Hidroperóxidos (HPC) en Hígado A, Intestino B, Cerebro C, Branquias D en *D. rerio* expuesto a 4 proporciones de un EH por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la mediana \pm Rango intercuartílico, n= 9. * Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). N= 378 peces.

Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). N= 378 peces.

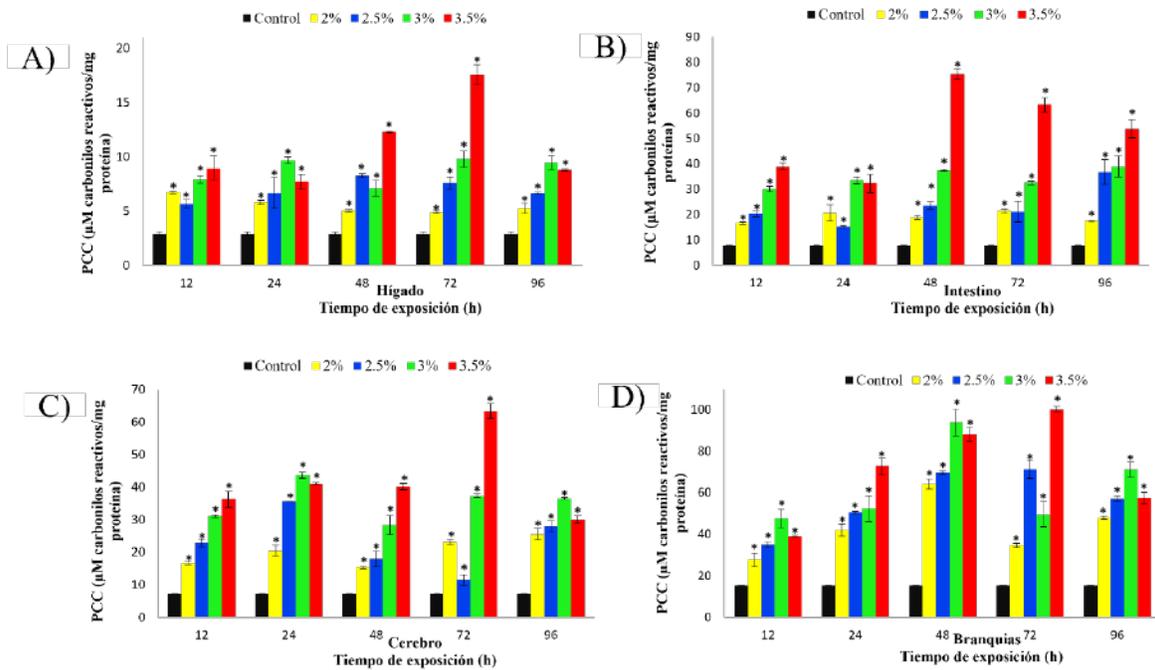


Figura 15 Contenido de proteínas carboniladas (PCC) en Hígado A, Intestino B, Cerebro C, Branquias D en *D. rerio* expuesto a 4 proporciones de un EH por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la mediana \pm Rango intercuartílico, n= 9. * Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). N= 378 peces.

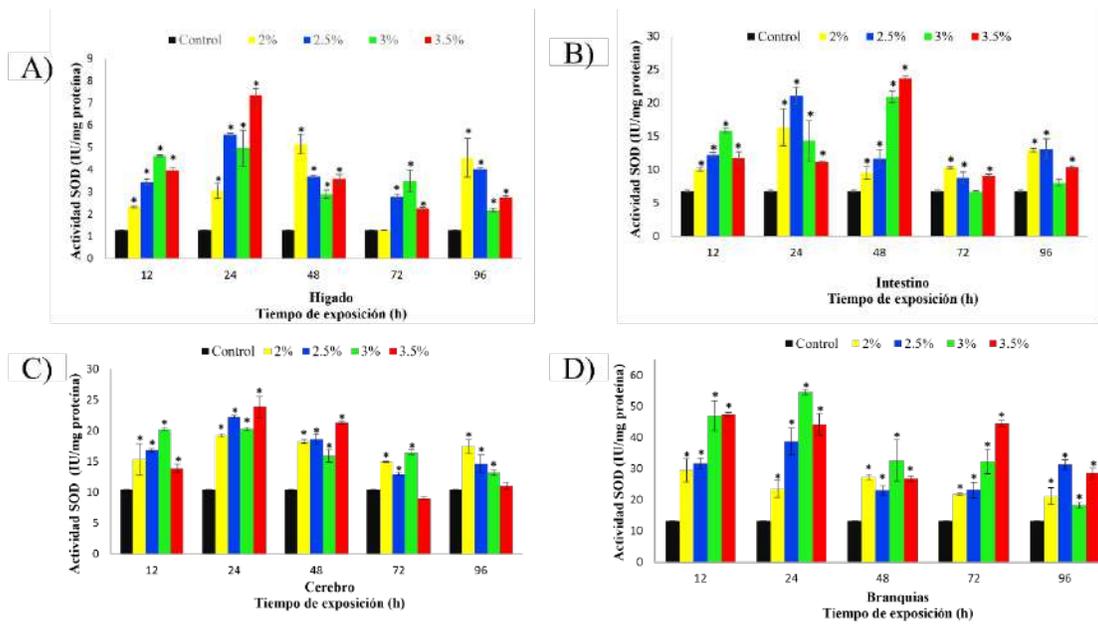


Figura 16. Actividad Superóxido dismutasa (SOD) en Hígado A, Intestino B, Cerebro C, Branquias D en *D. rerio* expuesto a 4 proporciones de un EH por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la mediana \pm Rango intercuartílico, $n = 9$. * Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). $N = 378$ peces.

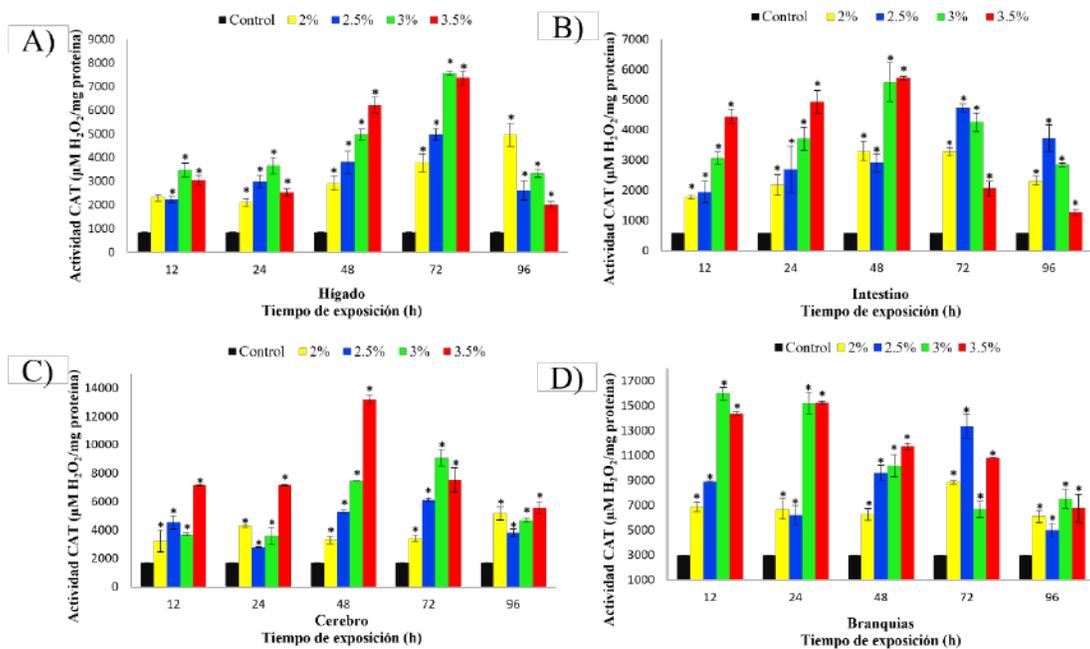


Figura 17. Actividad Catalasa (CAT) en Hígado A, Intestino B, Cerebro C, Branquias D en *D. rerio* expuesto a 4 proporciones de un EH por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la mediana \pm Rango intercuartílico, n= 9. * Significativamente diferente del grupo control, ANOVA Kruskal-Wallis y SNK ($p < 0.05$). N= 378 peces.

6.5 Expresión génica en hígado, intestino, cerebro y branquias

La expresión relativa de los genes *nrf2*, *cyp1a1*, *casp6*, *cat*, *casp9*, *sod* y *bax* en el hígado, intestino, cerebro y branquias de *D. rerio* se vio afectada después del tratamiento con 4 proporciones del EH (Figura 18). Se observó que, después de 96 h de exposición, los genes relacionados con el sistema antioxidante, *sod* y *cat*, incrementaron significativamente su expresión de forma dependiente a las proporciones del EH (*sod* hígado: $F(4, 10) = 261.68$, $p < 0.001$; $n = 3$; *sod* cerebro: $F(4, 10) = 344.60$, $p < 0.001$; $n = 3$; *cat* intestino: $F(4, 10) = 254.94$, $p < 0.001$; $n = 3$). No obstante, este patrón fue opuesto en el caso de *sod* y *cat* en branquias ($F(4, 10) = 441.62$, $p < 0.001$; $n = 3$; $F(4, 10) = 421.87$, $p < 0.001$; $n = 3$) y *cat* en cerebro ($F(4, 10) = 310.85$, $p < 0.001$; $n = 3$) ya que exhibieron un decremento en las proporciones más elevadas del EH. En el caso de *nrf2* hubo un incremento en los transcritos encontrados en la proporción más alta del EH (3.5 %), principalmente en branquias, cerebro e intestino (*nrf2* branquias: $F(4, 10) = 517.57$; $p < 0.001$; $n = 3$; *nrf2* cerebro $F(4, 10) = 498.71$; $p < 0.001$; $n = 3$; *nrf2* intestino: $F(4, 10) = 77.18$; $p < 0.001$; $n = 3$). Por otro lado, los genes relacionados con la apoptosis fueron regulados al alza en la mayoría de los órganos. Sin embargo, el hígado mostró un comportamiento contrastante, ya que en el caso de los genes *casp9*, *bax*, *casp6* y se descubrió un decremento en la expresión relativa conforme aumentaba la proporción del EH (*casp9*: $F(4, 10) = 13.33$; $p < 0.001$; $n = 3$; *bax*: $F(4, 10) = 87.73$; $p < 0.001$; $n = 3$; *casp6*: $F(4, 10) = 50.27$; $p < 0.001$; $n = 3$). El nivel de expresión de *cyp1a1* se elevó notablemente en hígado, branquias y cerebro de forma dependiente a la proporción del EH (Hígado; $F(4, 10) = 588.43$; $p < 0.001$; $n = 3$; Branquias: $F(4, 10) = 470.68$; $p < 0.001$; $n = 3$; Cerebro; $F(4, 10) = 258.83$; $p < 0.001$; $n = 3$). Se encontraron diferencias

significativas entre los grupos de tratamiento y control para casi todos los genes. Finalmente, para visualizar las variaciones de expresión del ARNm, se creó un mapa de calor para todos los genes y órganos analizados.

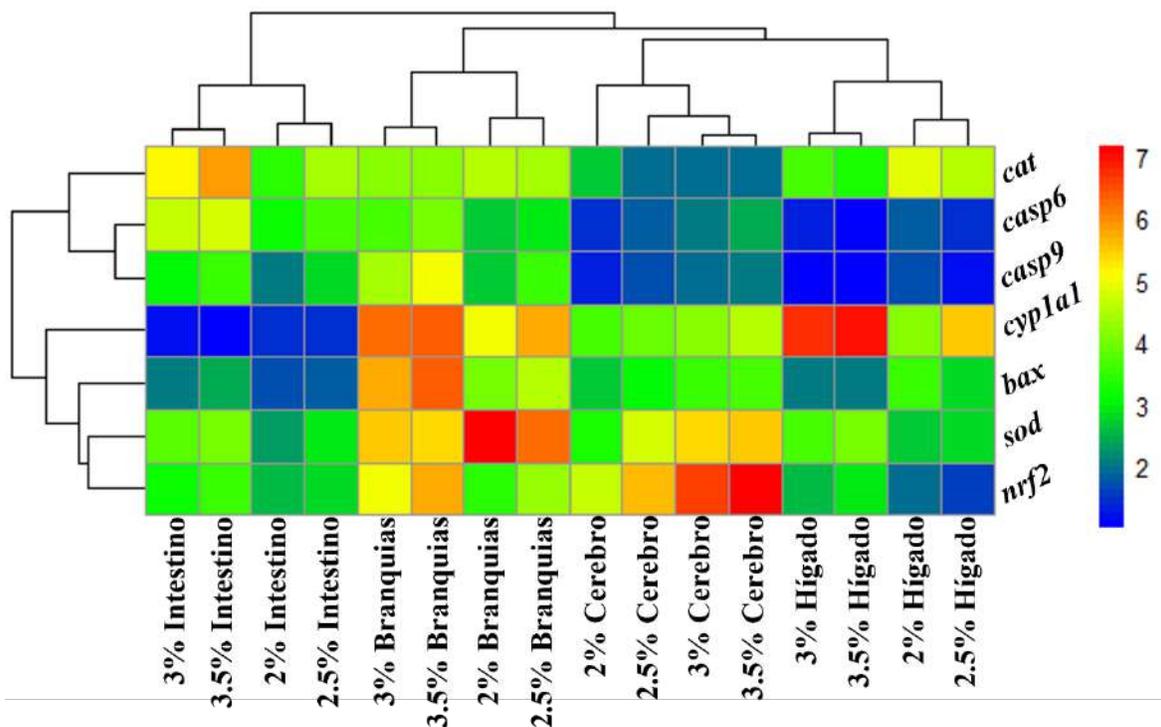


Figura 18. Mapa de calor para evaluar las variaciones en los niveles de expresión de transcritos de 7 genes después de la exposición a 4 proporciones de un efluente hospitalario a 96 h en hígado, intestino, cerebro y branquias en adultos de *D. rerio*. Los valores son el promedio \pm DS, $n = 3$. Se empleó una ANOVA-1 Fisher y SNK ($p < 0.05$). $N = 90$ peces.

6.6 Ubicación filogenética SOD y CAT

Los resultados muestran que muchas de las secuencias aminoacídicas evaluadas se encuentran más conservadas de lo esperado para una distribución aleatoria y que, en la mayoría de los casos esta conservación es estadísticamente significativa al nivel del 95 % ($p < 0.05$). La alineación múltiple reveló que las SOD comparten un patrón de consenso común con la secuencia enzimática de anfibios (*L. catesbeianus* y *X. laevis*) y el crustáceo *D. magna* (Figura 19). Mientras que la

enzima CAT presento un patrón de conservación aminoacídica más similar entre las especies que pertenecen al mismo grupo biológico.

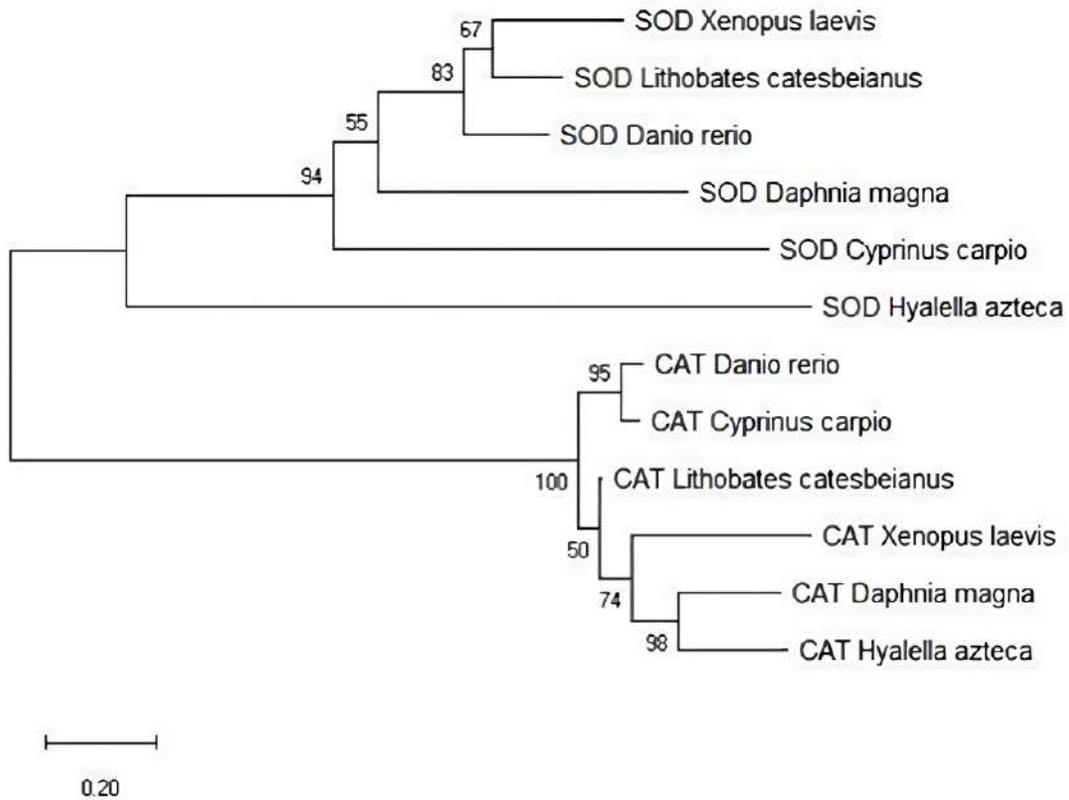


Figura 19. Se muestra el árbol filogenético inferido utilizando neighbor joining, el método de Máxima Verosimilitud y el modelo basado en matriz JTT. Este análisis involucró 12 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 977 posiciones en el conjunto de datos final. Los números representan los valores Bootstrap.

7. Discusión

Debido a la contribución inminente de contaminantes descargados en el medio ambiente por los EHs, estos son un tema de preocupación mayor a nivel internacional (Verlicchi, 2021). Aunque los parámetros de calidad del agua del EH se encuentran dentro de los límites máximos permisibles por la normatividad mexicana, la presencia de NaClO y cloruros derivados del tratamiento en la PTAR, pueden promover la generación de compuestos organoclorados (Emmanuel *et al.*, 2004). Ejemplo de ello es el paracetamol, cuya transformación química esta mediada por su interacción con NaClO dando lugar a por lo menos 11 subproductos (p. ej. 1,4 benzoquinona y N-acetil-p-benzoquinona imina) con un mayor potencial toxicológico que la molécula original (Cerro-López *et al.*, 2021). Otros parámetros como SST y el pH influyen en la biodisponibilidad de metales pesados mediante procesos de adsorción y por la presencia de iones metálicos bioactivos (p. ej. H_2AsO_4^-) (Cloran *et al.*, 2010).

Aunado a lo anterior y ante la presencia de xenobióticos, se espera una activación de la defensa antioxidante en organismos expuestos. Los resultados de SOD y CAT (Figuras 16 y 17) son indicativo del esfuerzo realizado por *D. rerio* para hacer frente a la mezcla compleja de fármacos, metales pesados y géneros bacterianos patógenos resistentes a antibióticos (Figuras 11 y 12) (Cuetero-Martínez *et al.*, 2023). Resultados similares han sido reportados en *Hyalella azteca* y *Danio rerio* (Gómez-Oliván *et al.*, 2019; Rosales-Pérez *et al.*, 2022).

No obstante, nuestros resultados muestran un decremento en la actividad SOD conforme incrementa el tiempo de exposición (48 h-96 h) (Figura 16). Se plantean 3 hipótesis para explicar el comportamiento enzimático de SOD. En primera instancia esta enzima es la única capaz de biotransformar el O_2^- a H_2O_2 . Por lo tanto, a pesar de que existen diferentes isoformas de la SOD (citosólica o mitocondrial), es probable que su rendimiento se vea mermado por un agotamiento enzimático producto de la exposición a mezclas complejas (Wang *et al.*, 2021; M. Liu *et al.*, 2019; Neri-Cruz *et al.*, 2015). Otra explicación viable es la carbonilación proteica (Figura 18) de ciertos aminoácidos (p. ej. metionina,

cisteína, lisina etc.,) cercanos al sitio activo, lo cual generaría un cambio conformacional y funcional de la SOD que impida el paso del anión O^{2-} al sitio catalítico (Lim *et al.*, 2019). Cabe mencionar que, los transcritos de *sod* se sobreexpresaron con mayor intensidad en branquias, cerebro e hígado (7.17, 5.52, 4.04 respectivamente) (Figura 18). Resultados similares han sido reportados por exposición a Cu (0.008 mg y 0.015 mg) y Cd (0.0019 mg y 0.0029 mg) (Craig *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2006). Esto nos hace pensar que la orden génica es procesada, sin embargo, el ambiente principalmente oxidativo a nivel intracelular podría mediar una pérdida de su función. Lo anterior guarda relación con la sobreexpresión del factor transcripcional *nrf2* detectado en todos los órganos quien funge como un sensor redox en el retículo endoplásmico con la finalidad de mantener la homeostasis celular (Bhakkiyalakshmi *et al.*, 2018). Mondal *et al.* (2019) demuestran que el gen *nrf2* se sobreexpresa en hígado cuando es expuesto a fluoruros (6.8 mg/L). Estudios previos revelan que *nrf2* regula la expresión de enzimas involucradas en los procesos de detoxificación de fase I y II incluyendo la Hemo-oxigenasa (HO-1), SOD, Glutación peroxidasa (GPx), sulfotransferasas (SULFs), γ -Glutamil-cisteína-ligasa (GCL) (Mondal *et al.*, 2019; Bhakkiyalakshmi *et al.*, 2018; Sant *et al.*, 2017; Loboda *et al.*, 2016). Finalmente, el glutatión reducido (GSH) podría jugar un papel crucial en la disminución de la actividad SOD, ya que al actuar como un agente quelante posiblemente contribuya a disminuir la concentración de metales traza (Cu, Zn y Mn) indispensables para esta metaloproteína (Steinbrueck *et al.*, 2020). Se sugiere que la actividad catalítica de SOD se encuentra subordinada a procesos post-transcripcionales, dado la falta de complementariedad entre los biomarcadores bioquímicos y moleculares a 96 h de exposición. Por otro lado, la actividad de CAT podría estimularse por el aumento desmesurado de H_2O_2 originado por SOD o por la activación de vías de señalización que lo emplean como segundo mensajero para desencadenar la apoptosis (Xiang *et al.*, 2016). El decremento catalítico de CAT fue menos pronunciado que el de SOD, posiblemente por la presencia de diversas enzimas que coadyuvan para hacer frente a la generación de H_2O_2 u otros

peróxidos, tal es el caso de la GPx, Tiorredoxinas o Peroxirredoxinas (S. Liu *et al.*, 2019; Hanschmann *et al.*, 2013).

Los resultados filogenéticos (Figura 19) muestran un alto grado de conservación aminoacídica de CAT entre diferentes grupos biológicos, no así para el caso de Cu/Zn SOD. Lo anterior podría servirnos para justificar su disminución catalítica semejante a lo que se ha reportado en anfibios los cuales son altamente sensibles a contaminantes (Eriyamremu *et al.*, 2008). Existen evidencia que respalda un deterioro en la defensa antioxidante de Cu/Zn SOD en *X. laevis* y *D. rerio* cuando son sometidos a diferentes xenobióticos (Eriyamremu *et al.*, 2008; M. Wang *et al.*, 2021). Lo antes mencionado guarda relación con la similitud en su secuencia aminoacídica, lo cual podría hacer más susceptible a la enzima de ser oxidada de forma irreversible o bien ser inhibida.

Durante la LPX, diferentes ácidos grasos poliinsaturados (AGPs) de la membrana plasmática (p. ej. ácido araquidónico, docosahexaenoico, linoleico, eicosapentaenoico etc.) reaccionan principalmente con radicales hidroxilos ($\text{HO}\cdot$). Este proceso inicia con la abstracción de un átomo de hidrógeno de AGPs, generando una reacción en cadena que da lugar a la formación de hidroperóxidos y sus compuestos de degradación, tal es el caso de epóxidos, pentano o aldehídos reactivos como el MDA y HNE (Kancheva y Angelova, 2017). La presencia de MDA (Figura 13 A) parece guardar relación con la actividad CAT a las 48 h en hígado (Fig. 14 A) de tal forma que si la actividad CAT incrementa puede disminuir de forma indirecta la presencia de radicales $\text{HO}\cdot$ (por la transformación de H_2O_2 a H_2O y O_2) ocasionando también disminución de la LPX (MDA). Cabe señalar que los niveles de $\text{HO}\cdot$ también están influenciados por la presencia de H_2O_2 y su interacción con Fe^{2+} mediante la reacción Fenton o la interacción del H_2O_2 y O_2^- por la reacción de Haber-Weiss (Ighodaro y Akinloye, 2018; Claiborne, 2018).

En intestino a las 12 h de exposición se detectó una mayor cantidad de MDA (Figura 13 B) incluso superior que a las 24 h y 48 h de exposición. Esto podría

relacionarse con una alteración en el catabolismo de ácidos grasos por la activación temprana de enzimas como las lipooxigenasas 5, 12 y 15 o ciclooxigenasas I y II en peces expuestos a fármacos y metales, lo cual se ha demostrado, favorece una disbiosis microbiana que puede intensificarse a mayores tiempos de exposición (72 h y 96 h) (Zheng *et al.*, 2022; Zang *et al.*, 2019; Sheng *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2018). Con respecto a lo antes mencionado, el intestino mostró ser el órgano con mayor sobreexpresión de *cat* y *casp6* con un aumento de 5.86 y 3.49 a la proporción del 3.5 % del EH. Stancová *et al.* (2015) advierten que, el gen *cat* desempeña un rol de desintoxicación crucial en la eliminación de EROs producidas por naproxeno (1 y 100 µg). Además, diversos estudios sustentan que la exposición a mezclas complejas de xenobióticos y bacterias oportunistas, promueven la disbiosis microbiana en *Danio rerio* (Zheng *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2021; González-Penagos *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2018). Como consecuencia, *D. rerio* puede sufrir un desequilibrio en la abundancia de especies del filo *Firmicutes* y *Bacteroidetes* por patógenos como *Mycobacterium spp.* y *Pseudomonas spp.* cuya ruta principal de infección es a nivel intestinal, con diseminación a otros órganos viscerales como el hígado, bazo y riñón (González-Penagos *et al.*, 2020; Harriff *et al.*, 2007) (Figuras 11 y 12). Con respecto a *Clostridium spp.*, se sabe tienen la capacidad de producir toxinas que causan enteritis necrotizante (Lopetuso *et al.*, 2013). Asimismo, *Legionella spp.* pueden ocasionar una enfermedad multisistémica grave (Legionellosis) (Wang *et al.*, 2019). Además, *P. acanthamoebae* (única *sp.* del género *Parachlamydia*) es una bacteria obligatoriamente intracelular, la cual tiene la capacidad de infectar células de macrófagos, y posteriormente inducir apoptosis (Greub *et al.*, 2003). Asimismo, en consonancia con nuestros resultados, el género *Aquicella* se ha descrito anteriormente junto con otros patógenos intracelulares como *Legionella spp.* y *Stenotrophomonas spp.* en sedimentos de cueva en Francia (García-Sánchez *et al.*, 2013). Por último, es primordial considerar que los biomarcadores bioquímicos y moleculares fueron posiblemente modificados no sólo por la presencia de xenobióticos en el EH, sino también por la concurrencia de bacterias patógenas y resistomas asociados a estas matrices antropogénicas. En

consecuencia, la comunidad microbiana (*Legionella*, *Pseudomonas*, *Parachlamydia*, *Mycobacterium*, etc.) podría infectar a *D. rerio* y promover respuestas inmunomoduladoras en el hospedador, debido a la liberación de endotoxinas (lipopolisacáridos) que finalmente desencadenan procesos oxidativos que explican en gran medida los daños detectados en los órganos diana del pez cebra. Por estas razones, el EH presentan un riesgo biológico adicional (Figuras 11 y 12).

Debido a la relación inherente que guarda el intestino con el cerebro es imprescindible hacer hincapié sobre el eje central Microbiota-Intestino-Cerebro el cual es un sistema de comunicación entre la microbiota intestinal, el sistema nervioso entérico y el cerebro. La LPX (MDA) y HPC en cerebro a las 72 h y 96 h (Figura 13 C y 14 C) se correlaciona con el MDA reportado en intestino (Figura 13 B) a los mismos tiempos de exposición. Por tanto, es posible especular que una disbiosis microbiana intestinal promueva la generación de sustancias proinflamatorias como las interleucinas (IL-6, TNF, IL-1) u otras sustancias neurotóxicas (p. ej. Proteínas amiloides o Lipopolisacáridos) que potencialmente ingresan al SNC a través de la circulación sistémica o el nervio vago, lo cual estimula la microglía y la neuroinflamación, incrementado la producción de EROs en el SNC y/o haciendo a las neuronas más susceptibles al estrés oxidativo (Wang *et al.*, 2020; Sheng *et al.*, 2018; Dumitrescu *et al.*, 2018).

El incremento de los biomarcadores de daño celulares (MDA, HPC y PCC) principalmente en branquias son un indicativo del daño oxidativo ocasionado por las EROs. En branquias vale la pena de resaltar que la variación de HPC a lo largo del experimento (Figura 14 D) podría explicarse por la degradación de los hidroperóxidos a nivel intracelular entre las 48 h y 72 h de exposición y la subsecuente generación de aldehídos reactivos como el MDA responsable de la LPX (Kancheva y Angelova, 2017). Además, es fundamental tener en consideración que es un importante órgano diana en peces teleósteos, ya que es responsable del intercambio gaseoso, excreción de compuestos de desechos nitrogenados, regulación acido-base, intercambio iónico y por estar implicado en

procesos de osmorregulación (Hwang, 2009; Evans *et al.*, 2005). El nivel de transcripción de todos los genes estudiados tuvo su mayor sobreexpresión en las branquias. Es de denotar, que el gen *cyp1a1* tuvo una expresión dependiente a la proporción del EH. Lo anterior está en concordancia con diversas investigaciones que sustentan el papel clave de *cyp1a1* en el metabolismo de compuestos químicos que inducen una respuesta de desintoxicación a nivel hepático y de branquias (Derikvandy *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2018).

Por otra parte, los AINES presentes en el EH se relacionan con una desregulación mitocondrial e incremento de la producción de O_2^- resultado del intermedio Oxy-Cyp1a1-Fe⁺³ (Galar-Martínez *et al.*, 2016; Neri-Cruz *et al.*, 2015). Mientras que la ranitidina aun cuando no se encuentra en concentraciones suficientes para generar toxicidad (>1000 mg/L), tiene la capacidad de unirse al citocromo P450 (Godoy *et al.*, 2020), dando lugar a la inhibición del metabolismo de AINES o fármacos catalizados (múltiples xenobióticos) por el sistema oxigenasa de función mixta que conlleva a una ineficiencia en los procesos de desintoxicación de fase I (Derikvandy *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2018).

Kataba *et al.* (2022) reportan que larvas de *D. rerio* expuestas a concentraciones de Pb (1, 10, 25 y 50 µg) (2110 µg en el EH) muestran una mayor actividad embrionaria, tal es el caso de espasmos musculares involuntarios, más movimientos/minuto y una respuesta antioxidante mediada por la actividad CAT y Glutación-S-Transferasa. Sin embargo, mayores concentraciones (100 y 500 µg) ocasionan un decremento en la actividad (bradicardia, desregulación de genes pro apoptóticos y disminución de la respuesta antioxidante). Los metabolitos intermedios del As³⁺ tienen la capacidad de inhibir cerca de 200 proteínas y enzimas. Entre ellas enzimas reparadoras del ADN, de defensa antioxidante e implicadas en la glucólisis. La inhibición ocurre por la unión del As a grupos sulfhidrilo de cisteínas localizadas en posiciones claves de la estructura proteica (Gökalp *et al.*, 2022). Valles *et al.* (2020) señalaron que concentraciones de As desde 0.05 mg /L y 0.5 mg/L (0.42 mg/L en el EH) pueden generar alteraciones transgeneracionales en *D. rerio* (Fo y F2) y cambios epigenéticos a nivel cerebral

al incrementar la metilación de histonas de empaquetamiento de ADN (H3K4me3), lo cual condiciona la regulación de expresión génica y por ende la capacidad transcripcional de respuesta antioxidante.

En combinación, Cd (II) y Cu (II) pueden exhibir una toxicidad sinérgica. Pilehvar *et al.* (2020) informan una alta tasa de mortalidad en peces adultos de *D. rerio* expuestos a mezclas de Cd (22.48 µg) y Cu (6.34 µg) cuya toxicidad de los iones metálicos aumenta con la disminución de la dureza del agua (< 100 mg/L). Esto ocurre porque el Cd tiene la capacidad de desplazar al Cu de sus complejos intracelulares. Lo anterior soportaría la reducción catalítica de SOD Cu/Zn en los diferentes órganos evaluados. Nuestros resultados están en concordancia con lo señalado por Ajitha *et al.* (2021) quienes reportan eventos apoptóticos en branquias de *D. rerio* después de la exposición a Zn (0.16 mg/L) y Hg (0.09 mg/L).

Los EHs reportan una alta ocurrencia de dexametasona (DEX) producto de la implementación de este en pacientes graves de COVID-19. La concentración de DEX en el EH resulta ser ambientalmente relevante ya que la concentración prevista sin efecto en peces (PNEC) es de 1 ng/L (Musee *et al.*, 2021). La DEX y el diclofenaco pueden ocasionar efectos adversos mediante un efecto sinérgico (Ukić *et al.*, 2019). Además, la exposición a DEX en *D. rerio* a 50 pM ([693.3 pM] en EH) genera cambios significativos en la expresión de *fbxo32* (Chen *et al.*, 2017). En particular, el gen *fbxo32* en peces es un gen relacionado con el procesamiento y la presentación de antígenos por MHC-I y el metabolismo de proteínas debido a que media la ubiquitinación y subsecuente degradación proteasomal de proteínas diana (Shi *et al.*, 2018). Se sabe que gen *fbxo32* se regula al alza en el intestino del pez gato cuando se expone a patógenos oportunistas (Li *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2018).

Existe evidencia de que metales pesados como el Pb, As y Cd repercuten en los procesos de reparación del ADN de doble hebra (inhibición de *brca2*) y actividad de ciertas chaperonas (p. ej. ADN J o ADN K), por tanto, las proteínas carboniladas generadas al no ser reparadas podrían ser ubiquitinizadas y metabolizadas por el proteosoma 26 S (Carlson y Van Beneden, 2014; Canedo y

Rocha, 2021; Doganlar *et al.*, 2016). De esta forma se generarían fragmentos que potencialmente pueden ser procesados y presentados como epítomos por parte del MHC-I a linfocitos CD4+ o linfocitos Natural Killer (NK) , que finalmente desencadenarían la liberación del factor TNF u otras citoquinas que estimularían la vía extrínseca apoptótica a través de la activación de receptores de muerte transmembranal (Figura 20). De igual manera, la regulación positiva transcripcional del gen *casp9*, observada en intestino y branquias a la proporción 3.5 % del EH (3.59 y 4.96 respectivamente), sugiere la activación de la vía intrínseca (Fig. 15) (Li *et al.*, 2020; Luzio *et al.*, 2013). Esto ocurre por la PMEM y la subsecuente liberación del citocromo C y unión a Apaf-1 para generar el apoptosoma y activar a la Casp9 (Félix *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2014; Luzio *et al.*, 2013). Esta hipótesis se ve sustentada por la sobrerregulación de *bax* quien es el responsable directo de la PMEM (Cheng *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020; Gonzalez *et al.*, 2006). Esta vía estaría mediada por un daño inminente hacia el ADN por la presencia de EROs que favorecerían la aparición de aductos con MDA, oxidación en la posición 8 de guaninas o daño directo por metales pesados que generen modificaciones de bases, dímeros de pirimidina, ruptura simple/doble de hebra, y entrecruzamiento intra/inter-hebra. Por último, la Casp6 sería el punto de inflexión de la apoptosis que conduce a la desmantelación del citoesqueleto y formación de cuerpos apoptóticos (Li *et al.*, 2020; Félix *et al.*, 2018).

A la luz de estos resultados, es fundamental replantearse la efectividad tecnológica que tienen las PTAR sobre los contaminantes presentes en los HEs y a su vez es acuciante la necesidad contemporánea de implementar estrategias de remediación *ad hoc* a estos compuestos recalcitrantes. Finalmente, las características fisicoquímicas del EH y sus compuestos químicos *per se* condicionan la transferencia de estos a diferentes compartimentos ambientales y con ello un mayor riesgo hacia el medioambiente y salud pública.

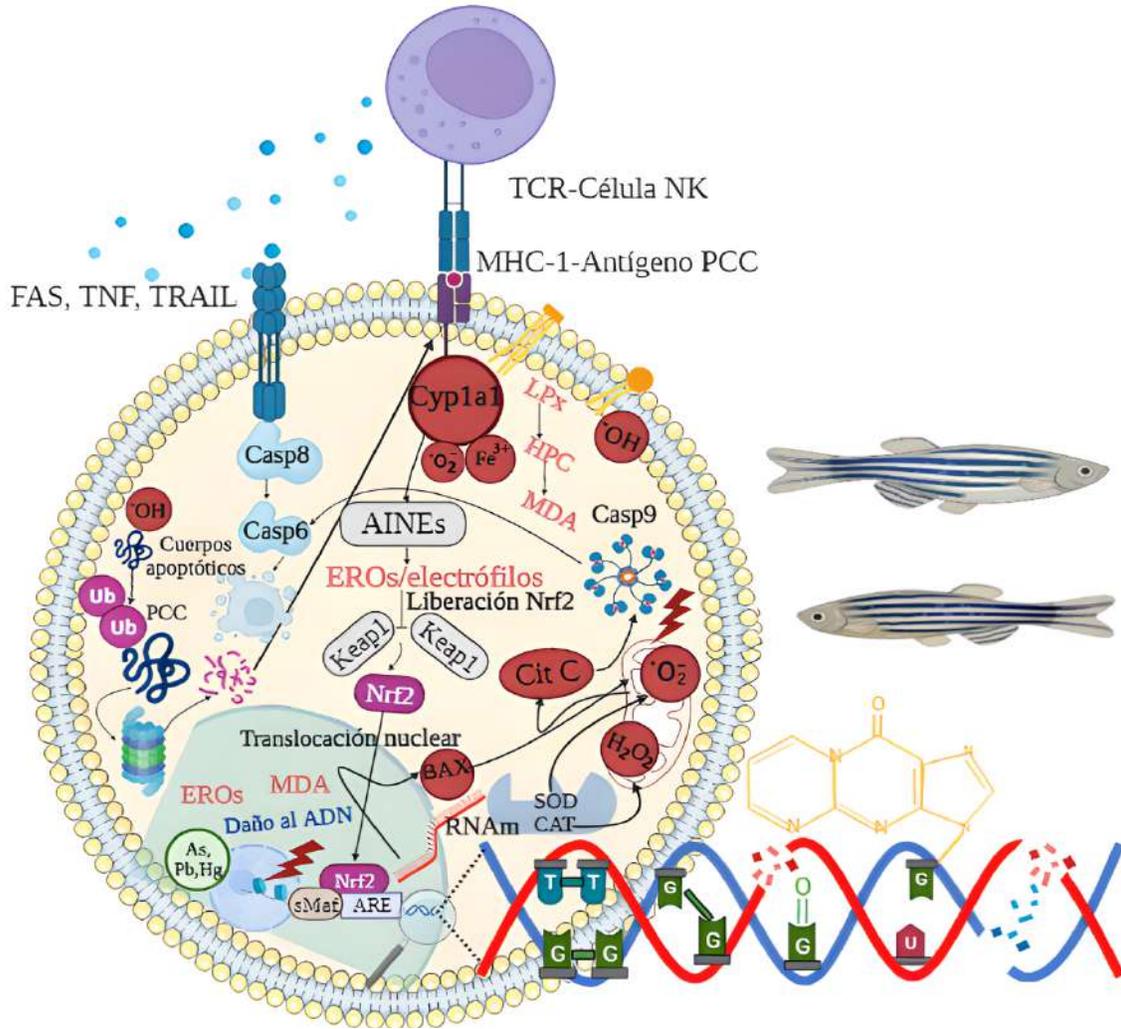


Figura 20. Mecanismo toxicodinámico propuesto a través del cual un efluente hospitalario induce daño en *D. rerio*.

8. Conclusiones

Los biomarcadores relacionados con oxidación celular (PCC, LPX, HPC), antioxidación (*cat* y *sod*) desintoxicación (*cyp1a1*) y apoptosis (*casp6*, *bax* y *casp9*) confirman el daño desencadenado en adultos de *D. rerio* tras la exposición a diferentes proporciones de un EH (2 %, 2.5 %, 3 % y 3.5 %). Nuestros resultados sugieren que el daño oxidativo se exagera cuando la defensa antioxidante decrece a mayores tiempos de exposición. La diversidad de contaminantes y géneros bacterianos patógenos posibilitan la aparición de interacciones tóxicas que explican en gran medida las alteraciones homeostáticas detectadas. Finalmente, es necesaria la generación de más investigaciones con enfoque integral y multifactorial que nos permita acceder a un panorama más amplio y con ello consolidar los mecanismos fehacientes por los cuales estas matrices antropogénicas complejas promueven el daño a organismos no objetivo.

9. Referencias

- Abdel-Khalek, A. A., Badran, S. R., Y Marie, M. A. S. (2020). The effective adsorbent capacity of rice husk to iron and aluminum oxides nanoparticles using *Oreochromis niloticus* as a bioindicator: biochemical and oxidative stress biomarkers. *Environmental science and pollution research*, 27, 23159-23171.
- Adams, S. M. (2002). Biological indicators of aquatic ecosystem stress: introduction and overview.
- Afsa, S., Sallem, O. F., Abdeljelil, N. B., Feriani, A., Najjar, M. F., Y Mansour, H. B. (2021). In vivo toxicities of the hospital effluent in Mahdia Tunisia. *Journal of Water and Health*, 19(3), 499-511.
- Afsa, S., Vieira, M., Nogueira, A. F., Mansour, H. B., Y Nunes, B. (2022). A multi-biomarker approach for the early assessment of the toxicity of hospital wastewater using the freshwater organism *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(13), 19132-19147.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar, M., Y Raisuddin, S. (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1523(1), 37-48.
- Ahmad, N., Ahmed, S., Vambol, V., Y Vambol, S. (2021). Treatment of drug residues (emerging contaminants) in hospital effluent by the combination of biological and physiochemical treatment process: a review. *Frontiers in Engineering and Built Environment*.
- Ajibola, A. S., Adebisi, A. O., Nwaeke, D. O., Ajibola, F. O., Y Adewuyi, G. O. (2021). Analysis, occurrence and ecological risk assessment of diclofenac and ibuprofen residues in wastewater from three wastewater treatment plants in south-western Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 25(3), 330-340.

- Ajitha, V., Sarasan, M., Sreevidya, C. P., Aswathy, C., Kachiprath, B., Mohandas, A., Singh, I. S. B., Hameed, A. S. S., Schlenk, D., Magnuson, J. T., Y Puthumana, J. (2021). Cytotoxic impacts of treated electroplating industrial effluent and the comparative effect of their metal components (Zn, Hg, and Zn+ Hg) on *Danio rerio* gill (DrG) cell line. *Science of The Total Environment*, 793, 148533.
- Alimba, C. G., Adekoya, K. O., Y Soyinka, O. O. (2019). Exposure to effluent from pharmaceutical industry induced cytogenotoxicity, hematological and histopathological alterations in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Excli journal*, 18, 63.
- Alimba, C. G., Ajiboye, R. D., Y Fagbenro, O. S. (2017). Dietary ascorbic acid reduced micronucleus and nuclear abnormalities in *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) exposed to hospital effluent. *Fish physiology and biochemistry*, 43(5), 1325-1335.
- Álvarez López, A. B. (2016). Búsqueda de alternativas experimentales para reducir costes en pruebas de diagnóstico molecular en cáncer.
- Anze, R., Franken, M., Zaballa, M., Pinto, M. R., Zeballos, G., Cuadros, M. D. L. Á., Canseco, Á., De La Rocha, Á., Estellano, V. H., Y Del Granado, S. (2007). Bioindicadores en la detección de la contaminación atmosférica en Bolivia. *Revista virtual REDESMA*, 1, 53.
- ASTM. (1994). American Society for Testing and Materials: Standard guide for designing biological tests with sediments. ASTM E 1521-94, Philadelphia.
- Atta, E. M., Mohamed, N. H., Y Silaev, A. A. A. (2017). Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *European Chemical Bulletin*, 6(8), 365-375.
- Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B., Y Rhee, S. G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide: role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 217-221.

- Baillie, T. A., Y Rettie, A. E. (2011). Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra-and inter-species differences in drug metabolism. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 26(1), 15-29.
- Belaid, C., Y Sbartai, I. (2021). Assessing the effects of Thiram to oxidative stress responses in a freshwater bioindicator cladoceran (*Daphnia magna*). *Chemosphere*, 268, 128808.
- Beltifa, A., Feriani, A., Alibi, S., Loco, J. V., Verschaeve, L., Anthonissen, R., Y Mansour, H. B. (2019). Genotoxicity assessment of the hospital wastewaters in Tunisia. *Journal of Environmental Toxicology and Analytical Research*, 1(1), 1.
- Beltrán, R. A., Y Gonza, K. (2017). Citotoxicidad y genotoxicidad de las aguas de los ríos Jequetepeque y Moche mediante el bioindicador ambiental *Vicia faba* L. *Scientia Agropecuaria*, 8(3), 203-213.
- Bhakkialakshmi, E., Sireesh, D., Y Ramkumar, K. M. (2018). Redox Sensitive transcription via Nrf2-Keap1 in suppression of inflammation. In *Immunity and Inflammation in Health and Disease* (pp. 149-161). Academic Press.
- Bonciu, E., Firbas, P., Fontanetti, C. S., Wusheng, J., Karaismailoğlu, M. C., Liu, D., Menicucci, F., Pesnya, D. S., Popescu, A., Romanovsky, A. V., Schiff, S., Ślusarczyk, J., De Souza, C. P., Srivastava, A., Sutan, A., Y Papini, A. (2018). An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*, 71(3), 191-209.
- Botello, A. V. (Ed.). (2005). *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. Univ. J. Autónoma de Tabasco.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., Y Boise, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology*, 14(1), 1-9.

- Bresciani, G., da Cruz, I. B. M., Y González-Gallego, J. (2015). Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Advances in clinical chemistry*, 68, 87-130.
- Buege, J. A., Y Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 52, pp. 302-310). Academic press.
- Buttke, T. M., Y Sandstrom, P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology today*, 15(1), 7-10.
- Canedo, A., Y Rocha, T. L. (2021). Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. *Science of the Total Environment*, 762, 144084.
- Cárdenas, A. M., Tataje, L. A., Florentini, E. A., Peña, C. G., Y Carranza, E. (2012). Oxidación de proteínas y lípidos en cerebro de cobayos durante la exposición a grandes alturas (4540 m). *Ciencia e Investigación*, 15(1), 36-41.
- Carlson, P., Y Van Beneden, R. J. (2014). Arsenic exposure alters expression of cell cycle and lipid metabolism genes in the liver of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*, 153, 66-72.
- Carrquiriborde, P. (2021). Principios de Ecotoxicología. *Libros de Cátedra*.
- Castro-Pastrana, L. I., Baños-Medina, M. I., López-Luna, M. A., Y Torres-García, B. L. (2015). Ecofarmacovigilancia en México: perspectivas para su implementación. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(3), 16-40.
- Cerro-López, M., Castro-Pastrana, L. I., Toledo-Wall, M. L., Gómez-Oliván, L. M., Y Saldívar-Santiago, M. D. (2021). Análisis de fármacos en aguas residuales de tres hospitales de la ciudad de Puebla, México. *Ingeniería del agua*, 25(1), 59-73.
- Chaudhry, F. N., Y Malik, M. F. (2017). Factors affecting water pollution: a review. *J. Ecosyst. Ecography*, 7(1), 225-231.
- Chelikani, P., Fita, I., Y Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61, 192-208.

- Chen, Q., Li, C., Gong, Z., Chan, E. C. Y., Snyder, S. A., Y Lam, S. H. (2017). Common deregulated gene expression profiles and morphological changes in developing zebrafish larvae exposed to environmental-relevant high to low concentrations of glucocorticoids. *Chemosphere*, 172, 429-439.
- Chen, Ying Ying, Y King Ming Chan. "Modulations of TCDD-mediated induction of zebrafish *cyp1a1* and the AHR pathway by administering Cd²⁺ in vivo." *Chemosphere* 210 (2018) 577-587.
- Cheng, B., Zhang, H., Jia, K., Li, E., Zhang, S., Yu, H., Y Lu, H. (2020). Effects of spinetoram on the developmental toxicity and immunotoxicity of zebrafish. *Fish & shellfish immunology*, 96, 114-121.
- Cid, F. D., Fernández, N. C., Pérez-Chaca, M. V., Pardo, R., Caviedes-Vidal, E., Y Chediack, J. G. (2018). House sparrow biomarkers as lead pollution bioindicators. Evaluation of dose and exposition length on hematological and oxidative stress parameters. *Ecotoxicology and environmental safety*, 154, 154-161.
- Claiborne, A. L. (2018). Catalase activity. In *CRC handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 283-284). CRC press.
- Cloran, C. E., Burton, G. A., Hammerschmidt, C. R., Taulbee, W. K., Custer, K. W., Y Bowman, K. L. (2010). Effects of suspended solids and dissolved organic carbon on nickel toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(8), 1781-1787.
- Cocker, J., Jones, K., Y Bos, P. M. (2014). Biological monitoring guidance values for chemical incidents. *Toxicology Letters*, 231(3), 324-327.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, 326(1), 1-16.
- Cortes-Diaz, M. J. A., Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., Dublán-García, O., Y Gómez-Oliván, L. M. (2017). Sublethal effects induced by captopril on *Cyprinus carpio* as determined by oxidative stress biomarkers. *Science of the Total Environment*, 605, 811-823.

- Craig, P. M., Wood, C. M., Y McClelland, G. B. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(5), R1882-R1892.
- Cuetero-Martínez, Y., de Los Cobos-Vasconcelos, D., Aguirre-Garrido, J. F., Lopez-Vidal, Y., Y Noyola, A. (2023). Next-generation sequencing for surveillance of antimicrobial resistance and pathogenicity in municipal wastewater treatment plants. *Current Medicinal Chemistry*, 30(1), 5-29.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Y Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324(1), 1-18.
- Deguenon, E., Dougnon, V., Houssou, V. M. C., Gbotche, E., Ahoyo, R. A., Fabiyi, K., Agbankpe, J., Mousse, W., Lougbegnon, C., Klotoe, J. R., Tchobo, F., Bankole, H., Y Boko, M. (2022). Hospital effluents as sources of antibiotics residues, resistant bacteria and heavy metals in Benin. *SN Applied Sciences*, 4(8), 1-12.
- Derikvandy, A., Pourkhabbaz, H. R., Banaee, M., Sureda, A., Haghi, N., Y Pourkhabbaz, A. R. (2020). Genotoxicity and oxidative damage in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to effluent from ethyl alcohol industry. *Chemosphere*, 251, 126609.
- Doganlar, O., Doganlar, Z. B., Muranlı, F. D. G., Y Guner, U. (2016). Genotoxic effect and carcinogenic potential of a mixture of as and cd in zebrafish at permissible maximum contamination levels for drinking water. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(3), 1-16.
- Dumitrescu, L., Popescu-Olaru, I., Cozma, L., Tulbă, D., Hinescu, M. E., Ceafalan, L. C., Gherghiceanu, M., Y Popescu, B. O. (2018). Oxidative stress and the microbiota-gut-brain axis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Emmanuel, E., Keck, G., Blanchard, J. M., Vermande, P., Y Perrodin, Y. (2004). Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environment international*, 30(7), 891-900.

- Eriyamremu, G. E., Osagie, V. E., Omoregie, S. E., Y Omofoma, C. O. (2008). Alterations in glutathione reductase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to Bonny Light crude oil and its fractions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 284-290.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., Y Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), 97-177.
- Félix, L. M., Vidal, A. M., Serafim, C., Valentim, A. M., Antunes, L. M., Monteiro, S. M., Y Coimbra, A. M. (2018). Ketamine induction of p53-dependent apoptosis and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, 201, 730-739.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791.
- Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology*, 20(4), 406-416.
- Frédéric, O., Y Yves, P. (2014). Pharmaceuticals in hospital wastewater: their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere*, 115, 31-39.
- Gabet-Giraud, V., Miege, C., Choubert, J. M., Ruel, S. M., Y Coquery, M. (2010). Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Science of the total environment*, 408(19), 4257-4269.
- Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Gómez-Olivan, L. M., Pérez-Coyotl, I., Mendoza-Monroy, D. J., Y Arrazola-Morgain, R. E. (2016). Oxidative stress and genotoxicity induced by ketorolac on the common carp *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology*, 31(9), 1035-1043.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo,

F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H-U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Y Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 19(1), 107-120.

García Calvo, E. (2019). Nuevas aproximaciones basadas en técnicas ómicas para la evaluación de los mecanismos de toxicidad de contaminantes alimentarios y ambientales.

García-Sánchez, A., Ariza Astolfi, C., Úbeda Ontiveros, J. M., Martín Sánchez, P. M., Jurado, V., Bastian, F., Alabouvette, C., Y Saiz-Jimenez, C. (2013). Free-living amoebae in sediments from the Lascaux Cave in France.

García-Medina, S., Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L. M., Ruiz-Lara, K., Islas-Flores, H., Y Gasca-Pérez, E. (2017). Relationship between genotoxicity and oxidative stress induced by mercury on common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Aquatic Toxicology*, 192, 207-215.

Gil, F., Y Pla, A. (2001). Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 21(4), 245-255.

Girardot, F., Monnier, V., Y Tricoire, H. (2004). Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster*. *BMC genomics*, 5, 1-16.

Godoy, A. A., de Oliveira, Á. C., Silva, J. G. M., de Jesus Azevedo, C. C., Domingues, I., Nogueira, A. J. A., Y Kummrow, F. (2019). Single and mixture toxicity of four pharmaceuticals of environmental concern to aquatic organisms, including a behavioral assessment. *Chemosphere*, 235, 373-382.

Godoy, A. A., Domingues, I., De Carvalho, L. B., Oliveira, Á. C., de Jesus Azevedo, C. C., Taparo, J. M., Assano, P. K., Mori, V., H, V. de A. V., Nogueira, A. J. A., Y Kummrow, F. (2020). Assessment of the ecotoxicity of the pharmaceuticals bisoprolol, sotalol, and ranitidine using standard and behavioral endpoints. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(5), 5469-5481.

- Gökalp, F. D., Doğanlar, O., Doğanlar, Z. B., Y Güner, U. (2022). The genotoxic effects of mixture of aluminum, arsenic, cadmium, cobalt, and chromium on the gill tissue of adult zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton 1822). *Drug and Chemical Toxicology*, 45(3), 1158-1167.
- Gómez-Oliván, L. M., Islas-Flores, H., Juan-Reyes, N. S., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Y Elizalde-Velázquez, A. (2019). Oxidative stress induced by water from a hospital effluent of the city of toluca, mexico, on *Hyalella azteca*. *Pollution of Water Bodies in Latin America: Impact of Contaminants on Species of Ecological Interest*, 79-95.
- Gómez-Oliván, L. M., Mendoza-Zenil, Y. P., SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., Ramírez-Durán, N., Martín-Doimeadios, R. D. C. R., Y Borja, R. P. P. (2017). Geno-and cytotoxicity induced on *Cyprinus carpio* by aluminum, iron, mercury and mixture thereof. *Ecotoxicology and environmental safety*, 135, 98-105.
- González, J. F., Y Ochoa, D. M. (2008). Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 55(II), 115-126.
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Y Bourdineaud, J. P. (2006). Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals*, 19(3), 225-235.
- González-Penagos, C. E., Zamora-Briseño, J. A., Cerqueda-García, D., Améndola-Pimenta, M., Pérez-Vega, J. A., Hernández-Nuñez, E., Y Rodríguez-Canul, R. (2020). Alterations in the gut microbiota of zebrafish (*Danio rerio*) in response to water-soluble crude oil components and its mixture with a chemical dispersant. *Frontiers in Public Health*, 8, 584953.
- Goodman, L. S. (1996). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (Vol. 1549, pp. 1361-1373). New York: McGraw-Hill.
- Gouy, M., Guindon, S., Y Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution*, 27(2), 221-224.

- Greub, G., Mege, J. L., Y Raoult, D. (2003). *Parachlamydia acanthamoeba* enters and multiplies within human macrophages and induces their apoptosis. *Infection and immunity*, 71(10), 5979-5985.
- Guadarrama-Tejas, R., Kido Miranda, J., Roldan Antunez, G., Y Salas Salgado, M. (2016). Contaminación del agua. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2(5), 1-10.
- Halliwell, B., Y Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., Y Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5(10), R245-R249.
- Hanschmann, E. M., Godoy, J. R., Berndt, C., Hudemann, C., Y Lillig, C. H. (2013). Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins—molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 19(13), 1539-1605.
- Harriff, M. J., Bermudez, L. E., Y Kent, M. L. (2007). Experimental exposure of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), to *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium peregrinum* reveals the gastrointestinal tract as the primary route of infection: a potential model for environmental mycobacterial infection. *Journal of fish diseases*, 30(10), 587-600.
- Haydel, S. E., Y Stout, V. (2015). A Kinesthetic Modeling Activity to Teach PCR Fundamentals. CourseSource.
- Heinloth, A. N., Irwin, R. D., Boorman, G. A., Nettesheim, P., Fannin, R. D., Sieber, S. O., Snell, M. L., Tucker, C. J., Li, L., Travlos, G. S., Vansant, G., Blackshear, P. E., Tennant, R. W., Cunningham, M. L., Y Paules, R. S. (2004). Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects. *Toxicological Sciences*, 80(1), 193-202.

- Henkart, P. A. (1996). ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death?. *Immunity*, 4(3), 195-201.
- Hockenbery, D. M. (1995). bcl-2, a novel regulator of cell death. *Bioessays*, 17(7), 631-638.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphary, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, Gerd- Jörg., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L. T., Guerra-Assunção, J. A., Zhou, Y., Y Teucke, M. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503.
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., Y Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801-811.
- Hwang, P. P. (2009). Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Biology*, 212(11), 1745-1752.
- Ighodaro, O. M., Y Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) (2021) "Ecotoxicología" SEMARNAT. Obtenido el día 06 de noviembre de 2021 de: <https://www.gob.mx/inecc/documentos/ecotoxicologia-fase-1>
- Islas-Flores, H., Manuel Gómez-Oliván, L., Galar-Martínez, M., Michelle Sánchez-Ocampo, E., SanJuan-Reyes, N., Ortiz-Reynoso, M., Y Dublán-García, O. (2017). Cyto-genotoxicity and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to a mixture of ibuprofen and diclofenac. *Environmental toxicology*, 32(5), 1637-1650.
- Jha, R. R., Singh, N., Kumari, R., Y Patel, D. K. (2017). Ultrasound-assisted emulsification microextraction based on a solidified floating organic droplet for the

rapid determination of 19 antibiotics as environmental pollutants in hospital drainage and Gomti river water. *Journal of separation science*, 40(13), 2694-2702.

Jia, Y. (2012). Real-time PCR. In *Methods in cell biology* (Vol. 112, pp. 55-68). Academic Press.

Jiang, J., Wu, S., Wu, C., An, X., Cai, L., Y Zhao, X. (2014). Embryonic exposure to carbendazim induces the transcription of genes related to apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 493-500.

Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., Y 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.

Kancheva, V. D., Y Angelova, S. E. (2017). Synergistic effects of antioxidant compositions during inhibited lipid autoxidation. *Lipid Peroxidation: Inhibition, Effects and Mechanisms*, Nova Science Publishers Inc., New York, 49-81.

Kannan, K., Y Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(3), 153-163.

Kataba, A., Botha, T. L., Nakayama, S. M., Yohannes, Y. B., Ikenaka, Y., Wepener, V., Y Ishizuka, M. (2022). Environmentally relevant lead (Pb) water concentration induce toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 252, 109215.

Kiechle, F. L., Y Zhang, X. (2002). Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta*, 326(1-2), 27-45.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Y Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.

Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0. 12.

- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., Y Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*, 79(17), 5112-5120.
- Kumari, A., Maurya, N. S., Y Tiwari, B. (2020). Hospital wastewater treatment scenario around the globe. In *Current developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 549-570). Elsevier.
- Lara-Flores, M., Y von Osten, J. R. (2011). Toxicogenomica: una nueva herramienta para estudiar los efectos de los contaminantes en los organismos. *JAINABoletín Informativo*, 22(1-AÑO), 63.
- Levet, A., Bordes, C., Clément, Y., Mignon, P., Morell, C., Chermette, H., Marote, P., Y Lantéri, P. (2016). Acute aquatic toxicity of organic solvents modeled by QSARs. *Journal of molecular modeling*, 22, 1-14.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., Y Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 233, pp. 346-357). Academic press.
- Li, C., Zhang, Y., Wang, R., Lu, J., Nandi, S., Mohanty, S., Terhune, J., Liu, Z., Y Peatman, E. (2012). RNA-seq analysis of mucosal immune responses reveals signatures of intestinal barrier disruption and pathogen entry following *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Fish & shellfish immunology*, 32(5), 816-827.
- Li, M., Cao, J., Zhao, Y., Wu, P., Li, X., Khodaei, F., Han, Y., Y Wang, J. (2020). Fluoride impairs ovary development by affecting oogenesis and inducing oxidative stress and apoptosis in female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 256, 127105.
- Li, S. W., Y Lin, A. Y. C. (2015). Increased acute toxicity to fish caused by pharmaceuticals in hospital effluents in a pharmaceutical mixture and after solar irradiation. *Chemosphere*, 139, 190-196.

- Lim, J. M., Kim, G., Y Levine, R. L. (2019). Methionine in proteins: it's not just for protein initiation anymore. *Neurochemical research*, 44, 247-257.
- Liu, C., Xu, H., Lam, S. H., Y Gong, Z. (2013). Selection of reliable biomarkers from PCR array analyses using relative distance computational model: Methodology and proof-of-concept study. *PLoS One*, 8(12), e83954.
- Liu, M., Ai, W., Sun, L., Fang, F., Wang, X., Chen, S., Y Wang, H. (2019). Triclosan-induced liver injury in zebrafish (*Danio rerio*) via regulating MAPK/p53 signaling pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 222, 108-117.
- Liu, S., Ding, R., Y 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.
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., Y Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, 73, 3221-3247.
- Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Petito, V., Y Gasbarrini, A. (2013). Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut pathogens*, 5, 1-8.
- Luja-Mondragón, M., Gómez-Oliván, L. M., SanJuan-Reyes, N., Islas-Flores, H., Orozco-Hernández, J. M., Heredia-García, G., Y Dublán-García, O. (2019). Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes. *Science of The Total Environment*, 660, 751-764.
- Luzio, A., Monteiro, S. M., Fontainhas-Fernandes, A. A., Pinto-Carnide, O., Matos, M., Y Coimbra, A. M. (2013). Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. *Aquatic toxicology*, 128, 183-189.
- Majumder, A., Gupta, B., Y Gupta, A. K. (2019). Pharmaceutically active compounds in aqueous environment: A status, toxicity and insights of remediation. *Environmental research*, 176, 108542.

- McGowan, A. J., Fernandes, R. S., Samali, A., Y Cotter, T. G. (1996). Anti-oxidants and apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 24(1), 229-233.
- Méndez-Cuadro, D. M. (2011). Proteómica redox de membrana de eritrocito humano en malaria y polimorfismos de grupos sanguíneos y G6PD.
- Misra, H. P., Y Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, 247(10), 3170-3175.
- Mondal, P., Shaw, P., Bandyopadhyay, A., Bhowmik, A. D., Chakraborty, A., Sudarshan, M., Y Chattopadhyay, A. (2019). Mixture effect of arsenic and fluoride at environmentally relevant concentrations in zebrafish (*Danio rerio*) liver: Expression pattern of Nrf2 and related xenobiotic metabolizing enzymes. *Aquatic Toxicology*, 213, 105219.
- Morel, Y., Y Barouki, R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemical Journal*, 342(3), 481-496.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Y Erlich, H. (1986, January). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 51, pp. 263-273). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Muñiz, P., Coma, M. J., Y Terán, J. (2014). ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO VASCULAR EN PROCESOS DE HIPOXIA. MALONDIALDEHIDO (MDA) COMO BIOMARCADOR DE DAÑO OXIDATIVO. *Electronic Journal of Biomedicine*, (2).
- Musee, N., Kebaabetswe, L. P., Tichapondwa, S., Tubatsi, G., Mahaye, N., Leareng, S. K., Y Nomngongo, P. N. (2021). Occurrence, fate, effects, and risks of dexamethasone: ecological implications post-COVID-19. *International journal of environmental research and public health*, 18(21), 11291.
- Nemtsas, P., Wettwer, E., Christ, T., Weidinger, G., Y Ravens, U. (2010). Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(1), 161-171.

- Neri-Cruz, N., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., del Socorro Romero-Figueroa, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Y SanJuan-Reyes, N. (2015). Oxidative stress in *Cyprinus carpio* induced by hospital wastewater in Mexico. *Ecotoxicology*, 24(1), 181-193.
- Niemi, L., Taggart, M., Boyd, K., Zhang, Z., Gaffney, P. P., Pflieger, S., Y Gibb, S. (2020). Assessing hospital impact on pharmaceutical levels in a rural 'source-to-sink' water system. *Science of The Total Environment*, 737, 139618.
- OECD, 2019. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Testing, Section 2: Effects on Biotic Systems. *Guidel. Test. Chem*, p. 10.
- Oliveira, T. S., Al Aukidy, M., Y Verlicchi, P. (2018). Occurrence of common pollutants and pharmaceuticals in hospital effluents. *Hospital wastewaters: characteristics, management, treatment and environmental risks*, 17-32.
- Oliveira, T. S., Murphy, M., Mendola, N., Wong, V., Carlson, D., Y Waring, L. (2015). Characterization of pharmaceuticals and personal care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Science of the total environment*, 518, 459-478.
- Olvera-Néstor, C. G., Morales-Avila, E., Gómez-Olivan, L. M., Galár-Martínez, M., García-Medina, S., Y Neri-Cruz, N. (2016). Biomarkers of cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects in *Cyprinus carpio* exposed to complex mixture of contaminants from hospital effluents. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 96, 326-332.
- OMS International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in risk assessment: validity and validation; 2001. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>.
- OMS/UNICEF Joint Water Supply, Sanitation Monitoring Programme, World Health Organization, OMS/UNICEF Joint Monitoring Programme for Water Supply, Y UNICEF. (2005). *Water for life: making it happen*. World health organization.

- ONU, 2015. Sustainable Development Goals. Recuperado el 07 de agosto de 2022, de Naciones Unidas website: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/water-and-sanitation/>.
- Orozco-Hernández, L., Gómez-Oliván, L. M., Elizalde-Velázquez, A., Natividad, R., Fabian-Castoño, L., Y SanJuan-Reyes, N. (2019). 17- β -Estradiol: Significant reduction of its toxicity in water treated by photocatalysis. *Science of The Total Environment*, 669, 955-963.
- Pérez-Álvarez, I., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Barceló, D., De Alda, M. L., Solsona, S. P., Y 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.
- Pilehvar, A., Cordery, K. I., Town, R. M., Y Blust, R. (2020). The synergistic toxicity of Cd (II) and Cu (II) to zebrafish (*Danio rerio*): Effect of water hardness. *Chemosphere*, 247, 125942.
- Pinilla, G., Cubillos, K., Y Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Nova*, 6(9).
- Qi, L., Ma, J., Song, J., Li, S., Cui, X., Peng, X., Wang, W., Ren, Z., Han, M., Y Zhang, Y. (2017). The physiological characteristics of zebra fish (*Danio rerio*) based on metabolism and behavior: a new method for the online assessment of cadmium stress. *Chemosphere*, 184, 1150-1156.
- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., Y Freeman, B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028-22034.
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S., Y Perkins, D. L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and biophysical research communications*, 469(4), 967-977.

- Regoli, F., Y Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine environmental research*, 93, 106-117.
- Repetto Jiménez, M., Y Repetto Khun, G. (2009). *Toxicología fundamental*. Ediciones Díaz de Santos.
- Rice, E. W., Bridgewater, L., Y American Public Health Association (Eds.). (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (Vol. 10). Washington, DC: American public health association.
- Rojano, B. A., Gaviria, C., Y Sáez Vega, J. A. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el Isoespintanol.
- Romano, L. A. (2016). Bioindicadores de contaminación acuática en peces. *Revista AquaTIC*, (7).
- Rosales-Pérez, K. E., Elizalde-Velázquez, G. A., Gómez-Oliván, L. M., Orozco-Hernández, J. M., Cardoso-Vera, J. D., Heredia-García, G., Y Galar-Martínez, M. (2022). Brain damage induced by contaminants released in a hospital from Mexico: Evaluation of swimming behavior, oxidative stress, and acetylcholinesterase in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 294, 133791.
- Rossi, W. M., Garrido, G., Y Sellés, A. J. N. (2016). Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(2), 62-83.
- Roy, S., Roy, S., Rana, A., Akhter, Y., Hande, M. P., Y Banerjee, B. (2018). The role of p38 MAPK pathway in p53 compromised state and telomere mediated DNA damage response. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 89-97.
- RStudio Team. RStudio: integrated development for R. RStudio, PBC, version 4.0.0. 2020. Accessed April 2020. <https://rstudio.com/>

- Rueda, I. M. (2017). Líquenes como bioindicadores de la calidad del aire. Universidad Complutense, 21.
- Saitou, N., Y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Salvesen, G. S., Y Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 10964-10967.
- Sanger, F., Y Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.
- Sant, K. E., Hansen, J. M., Williams, L. M., Tran, N. L., Goldstone, J. V., Stegeman, J. J., Hahn, M. E., Y Timme-Laragy, A. (2017). The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo. *Redox biology*, 13, 207-218.
- Santos, A. V., Couto, C. F., Lebron, Y. A. R., Moreira, V. R., Foureaux, A. F. S., Reis, E. O., Santos, L. V. D. S., De Andrade, L. H., Amaral, M. C. S., Y Lange, L. C. (2020). Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in water supply systems in Brazil. *Science of the total environment*, 746, 141011.
- Sanz, P. (1995). Los polimorfismos genéticos como causa de variabilidad individual de la toxicidad. *Temas escogidos de Toxicología*. Editorial Díaz de Santos. Madrid.
- Schmittgen, T. D., Y Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Schwartzman, R. A., Y Cidlowski, J. A. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine reviews*, 14(2), 133-151.
- Seoane, M., Esperanza, M., Y Cid, Á. (2017). Cytotoxic effects of the proton pump inhibitor omeprazole on the non-target marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Aquatic Toxicology*, 191, 62-72.

- Sheng, Y., Ren, H., Limbu, S. M., Sun, Y., Qiao, F., Zhai, W., Du, Z.Y., Y Zhang, M. (2018). The presence or absence of intestinal microbiota affects lipid deposition and related genes expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Frontiers in microbiology*, 9, 1124.
- Shi, H., Zhou, T., Wang, X., Yang, Y., Wu, C., Liu, S., Bao, L., Li, N., Yuan, Z., Jin, Y., Tan, S., Wang, W., Zhong, X., Qin, G., Geng, X., Gao, D., Dunham, R., Y Liu, Z. (2018). Genome-wide association analysis of intra-specific QTL associated with the resistance for enteric septicemia of catfish. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(6), 1365-1378.
- Sies, H., Berndt, C., Y Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- Silva, A. A. D. (2014). Respostas do sistema antioxidativo e metabolismo da glutationa em *Salvinia molesta* DS Mitchell (Salviniaceae) submetida ao arsenito.
- Sisinno, C. L. S., Y Oliveira-Filho, E. C. (2021). *Princípios de toxicologia ambiental*. Digitaliza Conteúdo.
- Soares, J., Coimbra, A. M., Reis-Henriques, M. A., Monteiro, N. M., Vieira, M. N., Oliveira, J. M. A., Y Santos, M. M. (2009). Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development after full life-cycle parental exposure to low levels of ethinylestradiol. *Aquatic Toxicology*, 95(4), 330-338.
- Stancová, V., Ziková, A., Svobodová, Z., Y Kloas, W. (2015). Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) naproxen on gene expression of antioxidant enzymes in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 40(2), 343-348.
- Steinbrueck, A., Sedgwick, A. C., Brewster, J. T., Yan, K. C., Shang, Y., Knoll, D. M., Vargas-Zuñiga, G. I., He, X. P., Tian, H., Y Sessler, J. L. (2020). Transition metal chelators, pro-chelators, and ionophores as small molecule cancer chemotherapeutic agents. *Chemical Society Reviews*, 49(12), 3726-3747.

- Świacka, K., Maculewicz, J., Kowalska, D., Caban, M., Smolarz, K., Y Świeżak, J. (2022). Presence of pharmaceuticals and their metabolites in wild-living aquatic organisms—current state of knowledge. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127350.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tamura, K., Stecher, G., Y Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tenorio-Chávez, P., Cerro-López, M., Castro-Pastrana, L. I., Ramírez-Rodríguez, M. M., Orozco-Hernández, J. M., Y Gómez-Oliván, L. M. (2020). Effects of effluent from a hospital in Mexico on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Science of The Total Environment*, 727, 138716.
- Thiebault, T., Chassiot, L., Fougère, L., Destandau, E., Simonneau, A., Van Beek, P., Souhaut, M., Y Chapron, E. (2017). Record of pharmaceutical products in river sediments: a powerful tool to assess the environmental impact of urban management?. *Anthropocene*, 18, 47-56.
- Toro-Restrepo, B. (2011). Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Luna Azul*, (32), 121-127.
- Ukić, Š., Sigurnjak, M., Cvetnić, M., Markić, M., Stankov, M. N., Rogošić, M., Rasulev, B., Božić, A. L., Kušić, H., Y Bolanča, T. (2019). Toxicity of pharmaceuticals in binary mixtures: assessment by additive and non-additive toxicity models. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 185, 109696.
- UNESCO. 2017. “¿Son las aguas residuales el nuevo “oro negro”?” Presentación pública del Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Y Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(2), 178-189.

- Valles, S., Hernández-Sánchez, J., Dipp, V. R., Huerta-González, D., Olivares-Bañuelos, T. N., González-Fraga, J., Y Bardullas, U. (2020). Exposure to low doses of inorganic arsenic induces transgenerational changes on behavioral and epigenetic markers in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 396, 115002.
- Verlicchi, P. (2021). Trends, new insights and perspectives in the treatment of hospital effluents. *Current opinion in environmental science & health*, 19, 100217.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., Y Barceló, D. (2012). Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of the total environment*, 430, 109-118.
- Vicedo-Tomey, A., Y Vicedo-Ortega, Y. (2000). Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 19(3), 206-212.
- Villaseñor-Basulto, D. L., del Real-Olvera, J., Y Ramírez, J. P. R. (2015). Remoción de Ciprofloxacina presente en Aguas Sintéticas empleando Moringa oleífera como Coagulante Natural. *Universidad de Guadalajara-Centro Universitario de Tonalá. México. Pág*, 14-15.
- Völker, D. (2007). Chemical-sensitive genes in zebrafish (*Danio rerio*) early development-identification and characterisation of differential expression in embryos exposed to the model compound 3, 4-dichloroaniline.
- Wang, C., Chuai, X., Y Liang, M. (2019). Legionella feeleii: pneumonia or Pontiac fever? Bacterial virulence traits and host immune response. *Medical microbiology and immunology*, 208, 25-32.
- Wang, C., Yuan, Z., Sun, Y., Yao, X., Li, R., Y Li, S. (2021). Effect of Chronic Exposure to Textile Wastewater Treatment Plant Effluents on Growth Performance, Oxidative Stress, and Intestinal Microbiota in Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Frontiers in microbiology*, 12, 782611.

- Wang, M., Zhao, J., Wu, L., Y Ma, T. (2021). Effects of 4-epianhydrotetracycline on oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science of The Total Environment*, 796, 149047.
- Wang, X., Hu, M., Gu, H., Zhang, L., Shang, Y., Wang, T., Zeng, J., Ma, L., Huang, W., Y Wang, Y. (2020). Short-term exposure to norfloxacin induces oxidative stress, neurotoxicity and microbiota alteration in juvenile large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Environmental Pollution*, 267, 115397.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H. Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., Macgregor, G. R., Thompson C. B., Y Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292(5517), 727-730.
- Wertz, I. E., Y Hanley, M. R. (1996). Diverse molecular provocation of programmed cell death. *Trends in biochemical sciences*, 21(10), 359-364.
- Willi, R. A., Faltermann, S., Hettich, T., Y Fent, K. (2018). Active glucocorticoids have a range of important adverse developmental and physiological effects on developing zebrafish embryos. *Environmental science & technology*, 52(2), 877-885.
- Wittlerová, M., Jirova, G., Vlkova, A., Kejlova, K., Maly, M., Heinonen, T., Wittlingerová, Z., Y Zimova, M. (2020). Sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos to hospital effluent compared to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Physiological Research*, 69(Suppl 4), S681.
- Xia, J., Lu, L., Jin, C., Wang, S., Zhou, J., Ni, Y., Fu, Z., Y Jin, Y. (2018). Effects of short term lead exposure on gut microbiota and hepatic metabolism in adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 209, 1-8.
- Xiang, J., Wan, C., Guo, R., Y Guo, D. (2016). Is hydrogen peroxide a suitable apoptosis inducer for all cell types?. *BioMed research international*, 2016.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S. A., Petit, P. X., Mignotte, B., Y Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of

mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *The Journal of experimental medicine*, 182(2), 367-377.

Zang, L., Ma, Y., Huang, W., Ling, Y., Sun, L., Wang, X., Zeng, A., Dahlgren, R. A., Wang, C., Y Wang, H. (2019). Dietary *Lactobacillus plantarum* ST-III alleviates the toxic effects of triclosan on zebrafish (*Danio rerio*) via gut microbiota modulation. *Fish & shellfish immunology*, 84, 1157-1169.

Zheng, Y., Wang, Y., Zheng, M., Wang, G., Y Zhao, H. (2022). Exposed to Sulfamethoxazole induced hepatic lipid metabolism disorder and intestinal microbiota changes on zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 253, 109245.