



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA



**“Embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por un efluente
hospitalario sobre la carpa común *Cyprinus carpio*”**

Tesis

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

Bio. Marlenee Luja Mondragón

DIRIGIDA POR:

DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVAN

DR. OCTAVIO DUBLAN GARCÍA

DRA. HARIZ ISLAS FLORES

TOLUCA ESTADO DE MÉXICO, OCTUBRE 2019

Agradecimientos

Agradezco a Dios por la oportunidad de lograr un objetivo más, por la oportunidad de seguir creciendo como persona, por mantenerme con salud y por las bendiciones que he recibido.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto, tanto por el apoyo económico para la realización de la tesis con el registro MSCSQS-0919, como el apoyo para la estancia de estudios.

Agradezco a mi familia por el apoyo brindado para poder realizar un objetivo más.

Agradezco a mis asesores Dr. Leobardo M. Gómez Olivan, Dr. Octavio Dublan García, Dra. Hariz Islas Flores, a la cordiandora Dra. Nelly María de la Paz González Rivas y a la Dra. Nely SanJuan-Reyes, por el apoyo y guía brindado durante la maestría.

Agradezco a mis compañeros: Francisco Escobar Huerfano, Gracias por tu apoyo y paciencia; a Manuel Orozco Hernández, Luis Orozco Hernández, Gerardo Heredia García e Itzayana Pérez -Álvarez gracias por los buenos momentos, el apoyo y por escucharme cuando recurrí a ustedes. A Carmen Ramírez (Car) gracias por los buenos momentos.

Índice

I.	Índice de tablas	5
II.	Índice de figuras.....	6
III.	Abreviaturas.....	7
IV.	Resumen.....	8
V.	ABSTRACT	9
1.	Introducción.....	10
2.	Antecedentes.....	12
2.1	Recurso agua.....	12
2.1.1.	Contaminación del agua.....	12
2.1.2.	Efluente hospitalario.....	13
2.1.3.	Contaminantes emergentes.....	14
2.1.4.	Parámetros físico-químicos	16
2.1.5.	Tratamiento de aguas residuales.....	19
2.2.	Estudios de toxicidad de efluentes hospitalarios.....	21
2.2.1.	Efluentes hospitalarios en México.....	22
2.3.	<i>Cyprinus carpio</i>	23
2.3.1.	Desarrollo embrionario de <i>Cyprinus carpio</i>	25
2.4.	Especies reactivas de oxígeno en el desarrollo	29
2.4.1.	Estrés oxidativo como mecanismo de teratogénesis.....	31
2.5.	Embriotoxicidad y teratogénesis	32
2.5.1.	Mecanismos de embriotoxicidad y teratogénesis	34
2.6.	Ensayo de Toxicidad Aguda en Embriones de Pez.....	35
3.	Justificación	37
4.	Hipótesis	38
5.	Objetivo general.....	38
5.1.	Objetivos específicos.....	38
6.	Metodología.....	39

6.1. Área de estudio, muestreo y caracterización del efluente.....	39
6.1.1. Área de estudio	39
6.1.2. Muestreo	40
6.1.3. Caracterización fisicoquímica	40
6.1.4. Cuantificación de metales.....	41
6.1.5. Cuantificación de grupos farmacéuticos.....	41
6.2 Prueba de toxicidad.....	42
6.2.1. Obtención de ovocitos	42
6.2.2. Prueba de embriotoxicidad y teratogénesis	42
6.2.3. Validez de la prueba	43
6.2.4. Determinación de la CL ₅₀ y EC ₅₀	43
6.2.5. Calculo del índice teratogénico index (TI).....	44
6.2.6. Evaluación de la embriotoxicidad	44
6.2.7. Evaluación de la teratogénesis.....	47
7. Resultados.....	48
7.1. Caracterización físico química y de los microcontaminantes presentes en el efluente hospitalario	48
7.1.1. Características fisicoquímicas del efluente hospitalario.....	48
7.1.2. Caracterización de los metales presentes en el efluente hospitalario	49
7.1.3. Caracterización de los fármacos presentes en el efluente hospitalario.....	50
7.2. Datos de embrioletalidad y teratogenicidad inducido por el efluente hospitalario	51
7.2.1. CL ₅₀ , CE ₅₀ e índice teratogénico a las 96 hpf.....	51
7.2.2. Efectos tóxicos inducidos por el fuente hospitalario (normales, muertos y malformaciones)	52
7.2.3. Embriotoxicidad inducida por el efluente hospitalario.....	53
8. Discusión	60
9. Conclusión	69
10. Bibliografía	70
11. Productos de la maestría	84

I. Índice de tablas

TABLA		PÁGINA
1	Puntuación de morfología general (GMS)	45-46
2	Características fisicoquímicas del efluente hospitalario	49
3	Microcontaminantes detectados en el efluente hospitalario	50
4	Concentración de los Fármacos encontrados en el efluente hospitalario	51
5	Porcentaje de mortalidad y malformaciones en ovocitos de <i>Cyprinus carpio</i> expuestos a efluente hospitalario	52

II. Índice de figuras

FIGURA		PÁGINA
1	Entidades productoras de carpa en México	24
2	Ciclo de vida de <i>Cyprinus carpio</i>	25
3	Desarrollo embrionario de <i>Cyprinus carpio</i> a las 12 HPF.	26
4	Desarrollo embrionario de <i>Cyprinus carpio</i> a las 24HPF.	27
5	Desarrollo embrionario de <i>Cyprinus carpio</i> a las 48 HPF.	27
6	Desarrollo embrionario de <i>Cyprinus carpio</i> a las 72 HPF.	28
7	Desarrollo embrionario de <i>Cyprinus carpio</i> a las 96 HPF.	29
8	Diseño experiemntal	38
9	Número de ovocitos normales, con teratogénesis y muertos a las 96 hpf, expuestos a diferentes proporciones del efluente hospitalario	53
10	Curva de Puntuación a la morfología general a las diferentes horas post fertilización en ovocitos expuestos a efluente hospitalario	54
11	Malformaciones inducidas por la exposición de ovocitos de <i>Cyprinus carpio</i> a diferentes proporciones del efluente Hospitalario.	55
12	Malformaciones en los ovocitos de la carpa común inducidas por la exposición al efluente hospitalario a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf, por diferentes proporciones de efluente hospitalario.	56-59

III. Abreviaturas

AINES	Antinflamatorios no esteroideos
AOX	Compuestos orgánicos halogenados
AOP	Proceso de Oxidación Avanzada
BOD	Demanda Bioquímica de Oxígeno
CAS	Procesos de Lodos Activados
CAT	Catalasa
CE	Conductividad Eléctrica
COX-1	enzima ciclooxigenasa 1
DCF	Diclofenaco
dpf	Días post fertilización
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EDAR	Tratamiento de aguas residuales
EH	Efluente Hospitalario
EO	Estrés Oxidativo
ERO`s	Especies Reactivas de Oxígeno
FET	Toxicidad Aguda en Embriones de Pez
GPx	Glutación Peroxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogeno
hpf	Horas Post Fertilización
IBP	Ibuprofeno
MBR	Reactores de Membranas de Ultrafiltración
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Radical Superóxido
OD	Oxígeno Disuelto
OH·	Hidroxilo
PFs	Productos Farmacéuticos
SOD	Superóxido dismutasa
SST	Sólidos Totales Suspendidos
TDS	Sólidos Totales Disueltos

IV. Resumen

Los contaminantes identificados en los hospitales se han asociado con efectos perjudiciales sobre los organismos acuáticos; sin embargo, es necesario continuar con más estudios para poder regular la descarga de dichos contaminantes, que generalmente se depositan sin previo tratamiento en el sistema de alcantarillado de la ciudad.

El presente estudio tuvo el propósito de evaluar las alteraciones del desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos en los ovocitos *Cyprinus carpio* después de la exposición a diferentes proporciones de efluentes hospitalarios. Para dicho propósito, se determinaron las propiedades fisicoquímicas del efluente y las concentraciones de los principales microcontaminantes. Se llevó a cabo un estudio de embriotoxicidad y la determinación de las principales alteraciones en el desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos producidos, debido a la exposición de *C. carpio* a diferentes proporciones del efluente. Los resultados mostraron que las propiedades fisicoquímicas estaban dentro de los valores permitidos por la regulación mexicana; sin embargo, se detectó la presencia de contaminantes como NaClO, metales, antibióticos, anti diabéticos, antiinflamatorios no esteroideos, hormonas y bloqueadores beta; los cuales se ha reportado que pueden tener efecto tóxico sobre los organismos acuáticos. La concentración letal (CL₅₀) fue de 5.65% y la concentración efectiva para malformaciones (CE₅₀) fue de 3.85%, con un índice teratogénico de 1,46.

Las principales alteraciones teratogénicas fueron: deformación del saco vitelino, escoliosis, modificación de la notocorda, malformación de la cola, la deformidad de las aletas e hiperplasia bucal.

Los resultados sugieren que el efluente del hospital bajo estudio es capaz de inducir embriotoxicidad y teratogenicidad en ovocitos de *C. carpio*.

V. ABSTRACT

Hospital functioning generates a great quantity of contaminants, among which organic materials, heavy metals, and diverse pharmaceuticals are noteworthy that can affect organisms if they are not properly removed from the effluents. The hospital effluent evaluated in the present study came from IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) Clinic 221 in downtown Toluca, State of Mexico, a secondary care facility. The contaminants identified in hospitals have been associated with deleterious effects on aquatic organisms; however, it is necessary to continue with more studies in order to be able to regulate the production of said contaminants which are generally dumped into the city sewage system. The present study had the purpose of evaluating the alterations to embryonic development and teratogenic effects on oocytes *Cyprinus carpio* after exposure to different proportions of hospital effluent. For said purpose, the physicochemical properties of the effluent were determined. Concentrations of the main microcontaminants were also determined. An embryotoxicity study out and the determination of the main alterations to embryonic development and teratogenic effects produced, due to exposure of *C. carpio* at different proportions of the effluent, were carried out. The results showed that the physicochemical properties were within the values permitted by Mexican regulation; however, the presence of contaminants such as NaClO, metals, anti-biotics, anti-diabetics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, hormones and beta-blockers, was detected. Lethal concentration (LC₅₀) was 5.65% and the effective concentration for malformations (CE₅₀) was 3.85%, with a teratogenic index of 1.46. The main teratogenic alterations were yolk deformation, scoliosis, modified chorda structure, tail malformation, fin deformity and mouth hyperplasia. A high rate of hatching delay was observed. The results suggest that the hospital effluent under study is capable of inducing embryotoxicity and teratogenicity in oocytes of *C. carpio*.

1. Introducción

Los hospitales consumen una gran cantidad de agua, generando una cantidad considerable de agua residual con una gran variedad de contaminantes que resultan de las actividades de diagnóstico, laboratorios de análisis clínicos, investigación, limpieza y excreción de medicamentos por los pacientes (Magdaleno *et al.*, 2014). Dentro de los contaminantes se incluyen productos químicos, metales pesados, desinfectantes y esterilizantes, detergentes, marcadores radioactivos y medios de contraste, así como principios activos de fármacos y sus metabolitos (Verlicchi *et al.*, 2010; Laffite *et al.*, 2016). Más de 300 residuos farmacéuticos, conjugados y otros residuos químicos se han detectado en concentraciones traza en efluentes hospitalarios (Fernández *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2017). El consumo creciente de estos compuestos y su ineficiente eliminación de las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR, por sus siglas en inglés), representan una amenaza para los ecosistemas acuáticos por su entrada continua a los ambientes naturales.

Estos compuestos experimentan varias vías de degradación cuando se liberan en aguas superficiales, incluida la degradación biótica (biodegradación, bioacumulación) y abiótica (oxidación, hidrólisis, fotólisis), por lo que pueden generar compuestos más tóxicos que la molécula original (Lin y Lin, 2015) y pueden ocasionar un impacto negativo para las especies acuáticas, como lesiones genéticas, daños en órganos y en la reproducción, cambios de comportamiento y bioquímicos, así como estrés oxidativo (Oliveira *et al.*, 2017). El estrés oxidativo (EO) es un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ERO`s) y las defensas antioxidantes. Las ERO`s son importantes para el desarrollo embrionario, ya que participan en procesos como la apoptosis, la activación de factores de transcripción y la diferenciación celular. Sin embargo, si el EO ocurre durante el desarrollo embrionario podría generar embriotoxicidad y teratogenicidad (Dennery, 2007), que puede determinarse a través de malformaciones estructurales o funcionales y por la muerte del embrión. Se han reportado los efectos tóxicos de los efluentes hospitalarios en diversas partes del mundo.

Los biomarcadores son una herramienta útil para la detección de la exposición y los efectos de la contaminación (Deutschmann *et al.*, 2016). El test de toxicidad Aguda en Embriones de Pez (FET, por sus siglas en inglés) test permite determinar la toxicidad aguda de una amplia gama de productos químicos que exhiben diversos modos de acción, solubilidades, volatilidades e hidrofobicidades, en las etapas embrionarias de los peces (OECD, 2013). Los peces se han utilizado como bioindicadores para evaluar la contaminación por diversos xenobióticos, debido a que tienen una gran interacción con el agua y sus sedimentos, además de que ocupan diferentes hábitats y niveles tróficos (San Juan-Reyes *et al.*, 2017). *C. carpio* pertenece a la familia *Cyprinidae* y son el grupo más importante de peces teleósteos cultivados en todo el mundo con fines comerciales debido a que es un producto alimenticio frecuentemente consumido por el ser humano (Huang *et al.*, 2007), además de que presentan varias ventajas como especies bioindicadoras como ser muy resistentes y fáciles de mantener. Toluca es un municipio del Estado de México en donde se encuentran aproximadamente 111 unidades, incluidos los hospitales de atención primaria, secundaria y terciaria, así como centros de salud, cuyas descargas de aguas residuales representan una amenaza para los cuerpos de agua (Le Corre *et al.*, 2012). Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar las alteraciones al desarrollo embrionario y efectos teratogénicos en ovocitos de *C. carpio* después de la exposición a diferentes proporciones de un efluente hospitalario.

2. Antecedentes

2.1 Recurso agua

El 70% de la superficie del planeta es agua, pero solo el 2.5% es agua dulce. De esta 68.9% se encuentra congelada, 30.8% se encuentra en aguas subterráneas y menos del 0.3% se almacena en agua superficial localizada en lagos, lagunas, ríos y humerales (Carabias y Landa, 2005). Menos del 1% de agua dulce del mundo está disponible para uso humano y mantenimiento de los ecosistemas. Siendo el agua un recurso limitante para la salud humana, la producción de alimentos, el desarrollo industrial y el mantenimiento de los ecosistemas naturales, así como la regulación del clima (Carabias y Landa, 2005).

Los seres humanos como los demás organismos vivos somos dependientes del agua. Ya que es empleada prácticamente en todas las actividades humanas, para consumo o para producir bienes y servicios. El uso antropogénico de este recurso altera la calidad del agua, disminuye su volumen y genera contaminación cuando los efluentes urbanos son vertidos a sus cauces (Antón y Díaz, 2000).

2.1.1. Contaminación del agua

La contaminación del agua se define como la adición de algún material que altere su composición química o su temperatura, causando daño a los organismos residentes o los seres que lo consumen (Heath, 1995). Dentro de los focos de contaminación acuática se encuentran las descargas domésticas, las agrícolas, la industria, el sector farmacéutico y hospitalario, los cuales incorporan numerosos productos de manera constante a cuerpos de agua, en donde se dispersan y pueden llegar a persistir por extensiones muy grandes (Fernández, 2012; Carraro, *et al.*, 2017). Entre los contaminantes más importantes encontrados en el agua se incluyen: detergentes, plaguicidas, petróleo y sus derivados, metales, fertilizantes, agentes patógenos y sustancias radiactivas (CONAGUA, 2017). En la actualidad se están estudiando otros productos que generan contaminación ambiental, como son los productos farmacéuticos, retardantes de flama, productos de higiene personal y aditivos industriales denominados como contaminantes emergentes (Barceló y López, 2007).

2.1.2. Efluente hospitalario

Los hospitales consumen una gran cantidad de agua, un hospital típico usa en promedio de 100 a 1,200 litros/persona/ día, generando una cantidad considerable de agua residual. El agua residual o efluente hospitalario (EH) es generado por todas las actividades que se llevan a cabo dentro de él, como son las actividades médicas, de diagnóstico y de limpieza (Sharma *et al.*, 2013; Magdaleno *et al.*, 2014).

Entre sus descargas se encuentra una gran variedad de contaminantes como son: materia orgánica, metales pesados, organismos patógenos, material de laboratorio, productos de desinfección, sustancias radiactivas y diversos productos farmacéuticos; así como sus metabolitos (Verlicchi *et al.*, 2010; Laffite *et al.*, 2016). Entre los productos farmacéuticos más reportados en el efluente hospitalario se encuentran: los antibióticos (16.1–2670 ng/L), analgésicos/anti-inflamatorios (123–6475 ng/L), anticonvulsivos, tranquilizantes (0.54–2 µg/L), anti-hipertensivos (0.71–2 µg/L), citostáticos, anticancerígenos (0.008–2 µg/L), hormonas sexuales (0.03–0.50 µg/L), entre otros (Li y Lin, 2015; Oliveira *et al.*, 2017). El EH se considera un foco potencial para generar resistencia bacteriana, por la cantidad significativa de antibióticos que incorporada al ambiente (Berto *et al.*; 2009).

El EH contiene una gran variedad de organismos patógenos como bacterias, protozoarios, helmintos y virus. Además, contiene una cantidad variable de compuestos químicos, dependiendo de las actividades que se desarrollen. Como el cloro, el cual puede reaccionar con compuestos orgánicos para formar organocloruro. También se ha reportado la presencia de cloroformo, bromodichlorometano, etanol y acetona, los cuales pueden tener efectos biológicos (Carraro *et al.*; 2016).

Si el hospital cuenta con terapia radiactiva, el EH incluso podría contener radioisótopos. Entre los radioisótopos reportados en este tipo de descarga, se encuentra I^{131} , Es^{89} Tc^{99} y Tl^{201} . Los cuales pueden ser eliminados por la orina, como es el caso del I^{131} , utilizado para el tratamiento de cáncer tiroideo (Nuñez, 2010). En algunos países como Francia, Alemania, Italia, Lituania y Países Bajos efluentes hospitalarios con este tipo de

contaminantes se recogen en habitaciones especiales y se depositan en fosas sépticas, donde son almacenados de 30 a 60 días, o hasta 2 años, dependiendo de la vida media del elemento radiactivo. Entre mayor sea la vida media del elemento radiactivo mayor será el riesgo significativo de acumulación del radioisótopo (Carraro *et al.*, 2016).

Los hospitales generan cantidades variables de efluentes, dependiendo de numerosos factores como son: el número de camas; edad de la instalación, prácticas de mantenimiento y limpieza; número y tipo de salas, número de pacientes, ubicación geográfica y el número y tipos de servicios existentes: como cocina, lavandería, sistemas de control de temperatura; etc. (Carraro *et al.*, 2016; Oliveira, 2017). Éstos compuestos son descargados a los sistemas de alcantarillado municipal, sin algún tipo de tratamiento previo o sea visto que el tratamiento que se les da no es suficiente para eliminar por completo los contaminantes (Magdaleno, *et al.*, 2014).

Los compuestos presentes en el efluente hospitalario sufren diversas formas de degradación y acumulación, biótica y abiótica cuando se liberan en agua, como son oxidación, hidrólisis, fotólisis, etc. Generando algunas veces compuestos más tóxicos que la molécula original Tampoco se descarta la posibilidad de generar un efecto sinérgico entre estos componentes (Diwan *et al.*, 2010; Magdaleno *et al.*, 2014; Li y Lin, 2015;) Lo que puede tener un impacto negativo en las especies acuáticas, como lesiones genéticas, daño a órganos, problemas de reproducción, cambios en el comportamiento y alteraciones bioquímicas, así como estrés oxidativo (Oliveira *et al.*, 2017).

2.1.3. Contaminantes emergentes

A pesar de que, en algunos países como Australia, China, India, Irán, Japón, Corea y Taiwán el efluente hospitalario recibe algún tipo de tratamiento de remoción de contaminantes, se ha reportado que algunos fármacos son persistentes, llegando a los cuerpos de agua (Li y Lin; 2015; Al Aukidy *et al.*, 2017). Los fármacos se han agrupado

dentro de los contaminantes emergentes, junto con los productos de cuidado personal, los retardantes de llama, los aditivos alimenticios, surfactantes, disruptores endocrinos y productos de estilo de vida como serían la cafeína y el tabaco. Se han denominado contaminantes emergentes a una amplia gama de compuestos químicos de distinta naturaleza, que incluyen a los nuevos productos sintetizados. Los contaminantes emergentes no están incluidos en los programas de monitoreo actual de aguas residual y cuerpos de agua, por lo que pasaban inadvertidos, ya que hay escasa o nula regulación de estos contaminantes en el ambiente; pero se incorporan de manera constante a los cuerpos de agua. Muchos de ellos son persistentes y pueden producir efectos adversos a los organismos o impacto a nivel ecológico (Barceló y López, 2007; Gil *et al.*, 2012).

Los productos farmacéuticos (PFs) son ampliamente consumidos a nivel mundial y son un foco importante de contaminación acuática. Ya que son descargados por los efluentes domésticos, por uso agropecuario, agrícola, industrial y en grandes cantidades por el efluente hospitalario (Verlicchi *et al.*, 2010). Los PFs son específicamente diseñados para tener efecto biológico, algunos son persistentes y lipofílicos, por lo que pueden llegar a bioacumularse (Boillot, 2008). Además, se ha visto que pueden llegar a producir metabolitos que son aún más resistentes y llegan a ser tóxicos para los organismos acuáticos (Islas Flores *et al.*; 2013). Los PFs de mayor consumo a nivel mundial son los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), los antibióticos, los cerebrovasculares dentro de los que sobresalen los anti-hipertensivos (como los β -bloqueadores) y los medicamentos hormonales (esteroides) (Moreno-Ortiz *et al.*, 2013).

Los PFs y sus metabolitos son depositados en los sistemas de alcantarillado en ocasiones llegan a plantas de tratamiento, donde dependiendo del proceso y la naturaleza de los fármacos estos son eliminados o no; llegando de manera directa o indirecta a ríos, lagos u arroyos. Dentro de las propiedades importantes de los PFs que determinan su persistencia se encuentra: la solubilidad, volatilidad, el grado de ionización, peso molecular, biodegradabilidad, polaridad y estabilidad, así como el pH del medio (Carraro *et al.*, 2016).

En cuerpos de agua, los PFs pueden fotodegradarse o biotransformarse, generando alteraciones en los organismos como son procesos fisiológicos anormales, disminución de la capacidad de reproducción, incremento de la toxicidad de otras sustancias por efecto sinérgico, aumento de casos de cáncer en humanos, resistencia a los antibióticos en cepas bacterianas y la muerte de los organismos (Fernández, 2012; Moreno-Ortiz *et al.*, 2013).

2.1.4. Parámetros físico-químicos

Para hacer el seguimiento de este tipo de efluentes y poder tener una idea de sus características, se determinan ciertos parámetros fisicoquímicos.

Dentro de las características físicas que se miden en muestras de agua se encuentran: el color, la turbidez, la temperatura y los sólidos, tanto suspendidos como disueltos.

El **color** es la capacidad de absorber ciertas radiaciones del espectro visible, indica la presencia de sustancias en suspensión o disueltas en el agua. La **turbidez** es causada por la dispersión o intercepción de los rayos luminosos, que se da por los sólidos coloidales disueltos en el agua, que impide que los rayos luminosos pasen a través de ella (Fernández, 2012).

La materia presente en el agua puede encontrarse: disuelta o en suspensión. Los **sólidos totales disueltos (TDS)** se refieren a cualquier mineral, sales, metales, cationes o aniones y pequeñas cantidades de materia orgánica que se disuelven en el agua. Los **sólidos totales suspendidos (SST)**, son todos los sólidos suspendidos extremadamente pequeños en el agua que no se sedimentarán por la gravedad (Al-Ajlouni *et al.*, 2009).

La **temperatura** elevada del agua puede ser indicador de actividad biológica, química o física y afecta la solubilidad de los gases disueltos en el agua; así la cantidad de sólidos disueltos. Alterando la mayoría de los procesos biológicos que tienen lugar en los sistemas acuáticos. (Fernández, 2012).

Dentro de los parámetros químicos encontramos: la conductividad eléctrica, el pH, dureza, oxígeno disuelto, demanda bioquímica de oxígeno, cloruro, nitritos y fluoruros.

El **pH** es la medida de la concentración de iones hidrogeno, y determina la naturaleza ácida o alcalina de la solución acuosa. Interviene en el equilibrio de diferente sustancia como los metales.

El **oxígeno disuelto (OD)** hace referencia a la cantidad de oxígeno disuelto en el agua, el cual proviene del aire o de la fotosíntesis de plantas acuáticas. El OD es consumido por los microorganismos en el proceso de oxidación de la materia orgánica e inorgánica y por los organismos acuáticos en el proceso de respiración (Fernández, 2012). La capacidad de las bacterias para oxidar materia orgánica en una muestra de agua, es denominada: **demanda bioquímica de oxígeno (BOD)** (Fernández, 2012).

La **DQO o Demanda Química de Oxígeno** es la medida total de todos los químicos presentes en el agua que pueden oxidarse. (Al-Ajlouni *et al.*, 2009). Los parámetros BOD y COD son ampliamente utilizados para caracterizar el contenido de materia orgánica del agua residual.

La **conductividad eléctrica (CE)** es la medida de la capacidad del agua para conducir la electricidad. Es indicativa de la materia ionizable, principalmente sales totales presente en el agua. El agua pura contribuye mínimamente a la conductividad (Fernández, 2012).

El agua tiene una gran cantidad de compuestos inorgánicos, los principales cationes son: calcio (Ca^{+2}), magnesio (Mg^{+2}), sodio (Na^+) y potasio (K^+); los aniones principales son: ion cloruro (Cl^-), sulfato (SO_4^-), carbonato (CO_3^{-2}) y bicarbonato (HCO_3^-) (Romero, 1999).

La **dureza** se define como la suma de todos lo cationes en el agua, pero los más importantes son el calcio y magnesio. Las aguas se clasifican como: blandas: 0-60 mg/L CaCO_3 , moderadamente blandas: 60-120 mg/l CaCO_3 y duras: > 120 mg/l CaCO_3 (Fernández, 2012).

El ion **cloruro** (Cl^-) es de las especies más importantes de cloro en agua. Los excrementos humanos, principalmente la orina, incrementan la cantidad de cloruros en aguas residuales. En concentraciones superiores a 250 mg/L producen un sabor salado (Romero, 1999).

Todos los compuestos que contienen flúor se disocian en **ion fluoruro** (F^-). La mayoría de los fluoruros son de baja solubilidad, por ello su concentración en aguas naturales es relativamente baja ≤ 1 mg/L. Una vez ingeridos son absorbidos y distribuidos por la sangre a todos los órganos y dada la afinidad especial del flúor con los huesos y los dientes, es ahí donde es captado y utilizado (Romero, 1999).

Algunos compuestos secundarios son conocidos como nutrientes, ya que son utilizadas por los vegetales marinos para formar sus tejidos. Como son el fosfato (PO_4)-3, nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y amonio (NH_4^+) (Romero, 1999).

Existen varias formas ambientalmente importantes del **nitrógeno**, el amoníaco NH_3 , el ion amonio NH_4 , el ion nitrato NO_3 , el ion nitrito NO_2 y el nitrógeno molecular N_2 (Fernández, 2012). En el proceso de **nitrificación** catalizada por microorganismo, el amoníaco y el ion amonio se oxidan a **nitrato**, mientras que con la desnitrificación el nitrato y el nitrito se reducen a nitrógeno molecular (Fernández, 2012).

Debido a su carga negativa el ion nitrato no es absorbido por el suelo y se convierte en **nitrito**, que en condiciones anaerobias produce metahemoglobinemia en los organismos e interfiere con el transporte de oxígeno (Fernández, 2012).

El **fosforo** es un elemento esencial en el crecimiento de las plantas marinas, principalmente las algas. Contenidos altos de fosforo en el agua pueden producir un crecimiento incontrolado de la biomasa acuática, conocido como eutrofización (Romero, 1999).

2.1.5. Tratamiento de aguas residuales

Se recomienda un **pretratamiento** de los EH antes de ser depositados junto con los efluentes municipales. La caracterización fisicoquímica nos puede ayudar a determinar el mejor tratamiento para este tipo de descargas antes de ser desechado en el alcantarillado municipal.

Trabajos anteriores reportan que a pesar de que estas descargas son sometidas a algún tipo de tratamiento residual previo, algunos de los contaminantes persisten y han sido identificados en plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR, por sus siglas en inglés) y en cuerpos de agua (Verlicchi *et al.*, 2010; Emmanuel *et al.*, 2005). Siendo necesario en ocasiones un segundo tratamiento de agua residual (Li y Lin, 2015). Dentro de los tratamientos usados se encuentra la **neutralización** ácido-base, la **filtración** y la **degradación microbiológica** para remover compuestos sólidos y materia orgánica (Carraro *et al.*, 2016).

Se están buscando nuevos procesos de tratamiento de agua residual que permitan la eliminación de los contaminantes persistentes, como son los fármacos. Entre los que se encuentra el uso de carbón activado, lodos activos, reactores de membrana de ultrafiltración, procesos de oxidación avanzada y el uso de procedimientos mixtos.

El **uso de carbón** en polvo o granular, parecen tener resultados en la remoción de contaminantes emergentes, en particular con los compuestos no polares (Snyder *et al.*, 2007). Se ha reportado una remoción de hasta un 90% de los disruptores endocrinos, determinado mediante pruebas de fármacos estándares. Pero es necesario considerar un correcto sistema de remoción y regeneración del carbón activo después del tratamiento (Verlicchi, *et al.*, 2010).

Se está investigando el uso de **procesos de lodos activados (CAS)** y **reactores de membranas de ultrafiltración (MBR)** para remover contaminantes emergentes (Verlicchi, *et al.*, 2010). Los MBR integran la degradación biológica con la filtración por membrana, mientras que el proceso de lodos activos para ser más lento. De manera general el sistema

de MBR supera los resultados del sistema convencional CAS en la remoción de fármacos (Radjenovic et al, 2009).

También están el **proceso de oxidación avanzada (AOP)**, por sus siglas en inglés), el cual se basa en la generación de radical hidroxilo (OH), como oxidante de compuestos orgánicos de elevada efectividad y baja selectividad. Novoa *et al.*, 2016, reporta que el AOP era efectivo en el tratamiento de un efluente farmacéutico, que principalmente contiene AINES, disminuyendo su toxicidad sobre *H. azteca* de CL₅₀ de 1.2% a CL₅₀ 341.7% después del tratamiento.

Dentro de los AOP, se agrupa la **ozonización**, la cual consiste en mejorar la degradabilidad de compuestos altamente reactivos al ozono como es el caso de antibióticos, hormonas, citostáticos, eritromicina, agentes de contraste de rayos X y carbamadiacepina. (Verlicchi, et al, 2010). Se reporta que es capaz de degradar ciprofloxacino, presente en un efluente hospitalario después de 30 minutos de tratamiento (Vasconcelos *et al.*, 2009).

Del mismo modo se está usando la **combinación** de procesos, como el microbiológicos y la reacción Fenton, para la remoción de fármacos en aguas residuales, obteniendo hasta un 90.6% una remoción de materia orgánica (Berto *et al.*, 2009). Así como el uso de RO después de emplear CAS O BMR en el tratamiento de un efluente, obteniendo una remoción hasta un 99% de los de fármacos presentes en efluente municipal (Sahar *et al.*, 2011).

Estos procesos son implementados en algunos países como son España. Italia, Australia, China antes de ser depositados junto con los efluentes domésticos (Al Aukidy *et al*; 2017). Bajas concentraciones de contaminantes presentes en los efluentes, no pueden que ser detectables por métodos analíticos, por lo que se recomienda utilizar sistemas biológicos para su detección (Magdaleno *et al.*, 2012).

2.2. Estudios de toxicidad de efluentes hospitalarios

Para determinar el efecto de diversos contaminantes sobre los organismos se emplean los **bioensayos**, los cuales consisten exponer diversas especies biológicas a distintas concentraciones de un contaminante en condiciones controladas de laboratorio. Los bioensayos son los métodos más empleados para el estudio del potencial tóxico de este tipo de mezclas complejas, se han empleado diversos organismos representantes de distintos niveles tróficos (Billot *et al.*, 2008).

Jolibois y Guerbet (2006) reportan que un EH de Francia causa genotoxicidad en 82% de las muestras de *Salmonella* expuestas a 3.3% del efluente. Pruebas de toxicidad en *P. subcapitata* y en *D. magna* muestran que la CL₅₀ a las 48 h fueron respectivamente de 3.9% y 4.9%, siendo más sensible al EH de Francia *P. subcapitata* (Boillot, 2008). Un EH de Argentina indujo efecto mutagénico en *Saccharomyces cerevisiae* aún a bajas proporciones del agua residual, a pesar que las descargas fueron inferiores a los límites permitidos en ese país (Paz *et al.*, 2008).

Un EH de Brasil es capaz de inducir citotoxicidad y genotoxicidad en *Allium cepa*, al inducir aberraciones cromosómicas, después de 24 horas de exposición. Se observa que después de tratar el efluente en un tanque séptico, el porcentaje de aberraciones disminuye, pero sigue generando alteraciones citotoxicidad (Bagatini *et al.*, 2009).

Un estudio de ecotoxicidad del EH de Polonia concluyendo que el organismo más sensible a la descarga fue *P. subcapitata* con CE₅₀ de 18.77%, los crustáceos *Daphnia magna* y *Thamnocephalus platyurus* obtuvieron valores de CE₅₀ de 20.76% y 22.62% respectivamente. El efecto más bajo fue observado para *Artemia salina* EC₅₀ 59.77% y *Vibrio fischeri* EC₅₀ 46.17% (Zgórska *et al.*, 2011).

Un EH de Argentina mostró tanto inhibición, como estimulación del crecimiento en dos algas: *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Chlorella vulgaris* lo que indica que el efluente contiene sustancias tóxicas y también nutrientes (folatos y nitritos). Así como afectos genotóxicos en *Salmonella sp.* (Magdaleno *et al.*, 2012).

Magdaleno *et al.*, (2014) reportan que muestras de un EH de Argentina puede inhibir el crecimiento del alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, así como producir daño genotóxico en *Allium cepa*; daño correlacionado con el antibiótico ciprofloxacino.

2.2.1. Efluentes hospitalarios en México

En México no existe legislación con respecto a la entrada de contaminantes emergentes en los cuerpos de agua, y las plantas de tratamiento de aguas residuales hospitalarias son escasas. Por lo que estas descargas en la mayoría de los hospitales se depositan de manera directa a los sistemas de alcantarillado, llegando a los cuerpos de agua, donde pueden ser tóxicas para los organismos acuáticos.

El ensayo de toxicidad con organismos acuáticos de vida libre se ha propuesto como una prueba rápida, económica y eficiente para analizar muestras de agua residuales (Aguirre-Martínez, *et al.*, 2015).

Se realizó un estudio de toxicidad de 3 efluentes hospitalarios en Puebla, dos de esas descargas resultaron tóxicas para *Daphnia magna* a las 48 horas de exposición, con valores de CL₅₀ 0.41%, el cual no cuenta con planta de tratamiento y el segundo hospital reporto una CL₅₀ de 33.15%, el cual reporto una alta cantidad de CaCO₃. También se observa una mayor toxicidad en efluentes que no cuentan con planta de tratamiento (Villegas-Navarro *et al.*, 1997).

Olvera-Néstor *et al.*, (2016) después de exponer organismos de *Cyprinus carpio* a aguas de un efluente hospitalario reportó daño genotóxico y citotóxico en eritrocitos, determinado mediante una rápida activación de la apoptosis y un incremento de la cantidad de micronúcleos después de 48 horas de exposición.

Neri-Cruz *et al.*, (2015) reporta que la exposición al efluente hospitalario de una clínica del Estado de México; indujo estrés oxidativo en especies juveniles de *Cyprinus carpio*. Generando un incremento en el contenido de hidroperóxidos, malondialdehído y proteínas carboniladas en branquias, cerebro e hígado, así como un incremento de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en hígado y cerebro.

Los peces han sido ampliamente utilizados como bioindicadores de contaminación acuática, ya que se encuentran en contacto permanente y forma directa con los contaminantes en el agua y sus sedimentos, haciéndolos más susceptibles a estos (Velásquez y Vega, 2004; Altamirano-Lozano, 2005). *Cyprinus carpio* es un ejemplo de un bioindicador utilizado para determinar la calidad del agua por su sensibilidad a diversos xenobióticos, resistencia a altas temperaturas y su amplia distribución geográfica (Lászlo *et al.*, 2002). Ha sido empleada en estudios de ecotoxicidad, mediante la prueba de estrés oxidativo, demostrando daño temprano en organismos acuáticos (Islas-Flores *et al.*, 2013; Neri-Cruz *et al.*, 2015).

2.3. *Cyprinus carpio*

La carpa común (*Cyprinus carpio*) es una especie cultivada en países asiáticos, europeos y algunos países de América central, se emplea principalmente para consumo humano. (Lászlo *et al.*, 2002; FAO, 2017).

Es la especie con más historia en la acuicultura de México, se encuentra posicionada en el 8° lugar de la producción pesquera y está ampliamente distribuida en el territorio nacional. De acuerdo con el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, en el 2017 se produjeron 30,300 toneladas en el país (SAGARPA, 2017).



Figura 1. Entidades productoras de carpa en México (SAGARPA, 2017).

Cyprinus carpio es un pez de agua dulce, miembro de la familia de los ciprínidos. Vive en las corrientes medias y bajas de los ríos y en aguas poco profundas como lagos y embalses de agua. Es ampliamente cultivada debido a su amplia tolerancia de temperatura, resistencia a condiciones de poco oxígeno disuelto, su alimentación omnívora y su tolerancia a las salinidades de hasta el 5%. El mejor crecimiento se obtiene en un intervalo de temperatura entre 23 °C y 30 °C, pero pueden sobrevivir a períodos cortos de inviernos fríos. La gama de pH óptimo es 6.5-9.0 (Lászlo *et al.*, 2002; FAO, 2017).

Las carpas alcanzan su madurez sexual entre los 18 meses y dos años de vida, dependiendo de la temperatura de la región. Los adultos miden en promedio 71 cm. Para su reproducción la temperatura ideal debe ser en promedio de 24 °C, cuando se incrementa de la temperatura de 26- 27 °C se puede inducir el desove (Park *et al.*, 2017). En zonas templadas la reproducción es anual, pero si reciben tratamiento hormonal las carpas liberan sus huevos maduros dentro de un período más corto, lo que hace posible "ordeñar" a los reproductores para obtener sus gametos (Lászlo *et al.*, 2002; FAO, 2017).

En condiciones naturales la hembra deposita los huevos, en promedio 100,000 - 300,000 huevos por kilogramo de peso sobre sustrato vegetal.

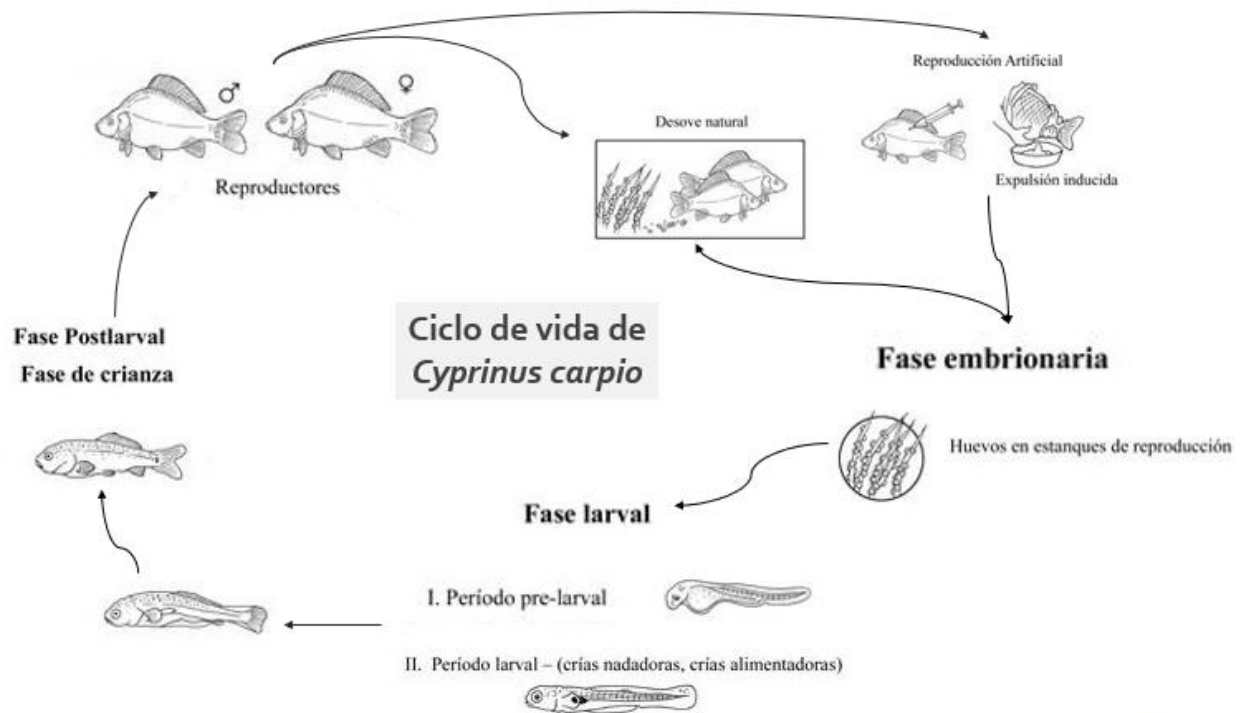


Figura 2. Ciclo de vida de *Cyprinus carpio* (FAO, 2017)

2.3.1. Desarrollo embrionario de *Cyprinus carpio*

El desarrollo embrionario de la carpa es posible en un rango de pH de 4.5- 9.5, en los pH de 5 y 10 los huevos mueren 24 horas después de la fertilización (FAO, 2019). El rango óptimo de desarrollo embrionario es de 21-25 °C (OECD 2012, 1998).

El desarrollo de los huevos fertilizados, que son transparentes o amarillos, inicia inmediatamente después de la fertilización y la embriogénesis se completa entre 3 y 5 días a 23°C (FAO, 2019). La primera división se da 30 minutos después de la fertilización. A las 2 horas presenta 8 blastómeros, se divide cada 40 min aproximadamente hasta llega un estadio de 128 células. Este periodo comprende el estadio de blástula (Mojer, 2015).

A las 4 horas aprox. Inicia el periodo de gástrula, el cual se diferencia por la migración celular, mejor conocido como epibolia (Mojer, 2015). A las 8-10 horas inicia el proceso de segmentación en el cual se diferencian las capas embrionarias. Aparece el primordio óptico y aparecen las somitas, hasta completar las 28 somitas (Mojer, 2015).

12 horas post fertilización (hpf). Se observa la vesícula óptica (1), vesícula de Kupffer (1), el cual dará lugar a la cola (total=2, en la puntuación de Hersem).

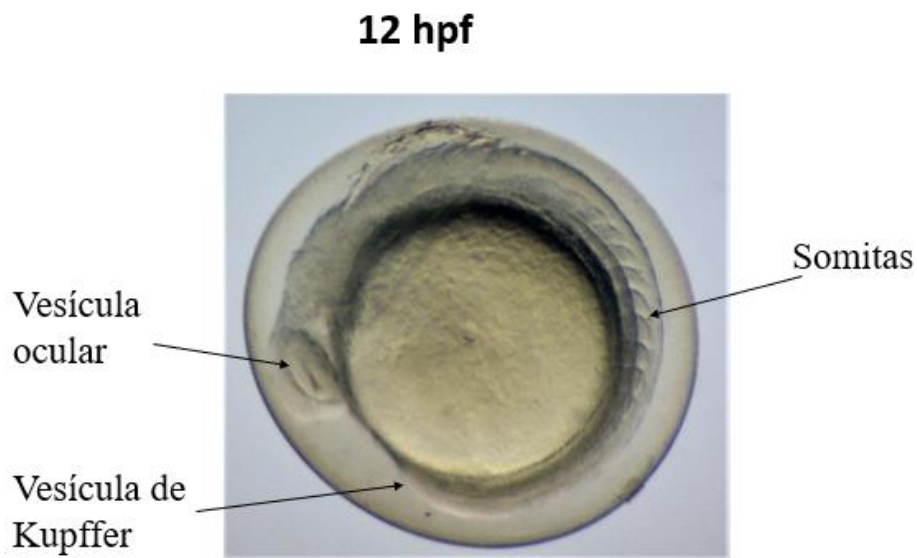


Figura 3. Desarrollo embrionario de *Cyprinus carpio* a las 12 hpf

24 hpf. Se desarrolla la notocorda (2 puntos), el desarrollo de somitas (1 punto) aparece el disco retinal (2 puntos) así como la pigmentación del mismo, el embrión empieza a tener movimiento (1 punto), corazón latido (1) y circulación (1) (Mojer, 2015).

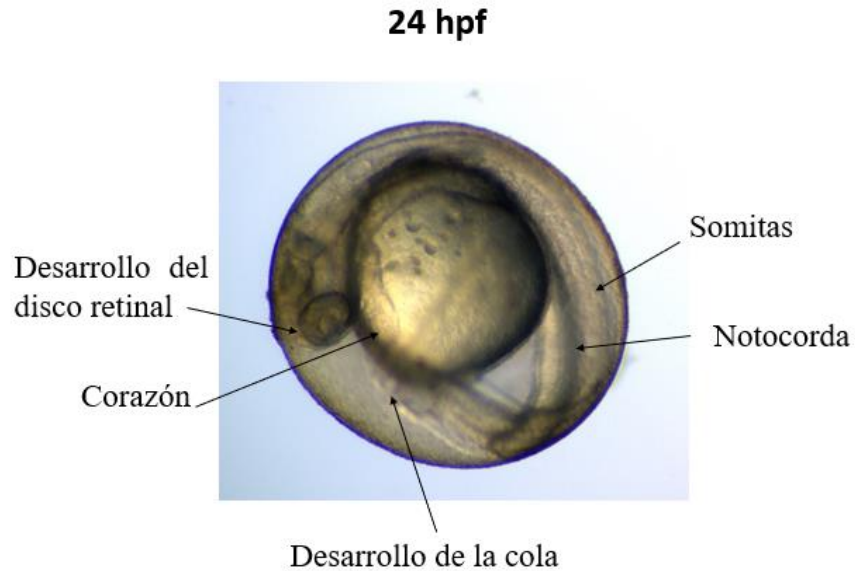


Figura 4. Desarrollo embrionario de *Cyprinus carpio* a las 24 HPF.

48 hpf. La cola sigue creciendo apareciendo la aleta caudal (3 puntos), las somitas se diferencian (1), los ojos desarrollados y pigmentados (3), los movimientos de la larva aumentan (1), el corazón termina su desarrollo y se observa latir (1), generando circulación sanguínea en todo el cuerpo (1), también se observa pigmentación de la cabeza, el cuerpo (1) y la cola (1) (Mojer, 2015).

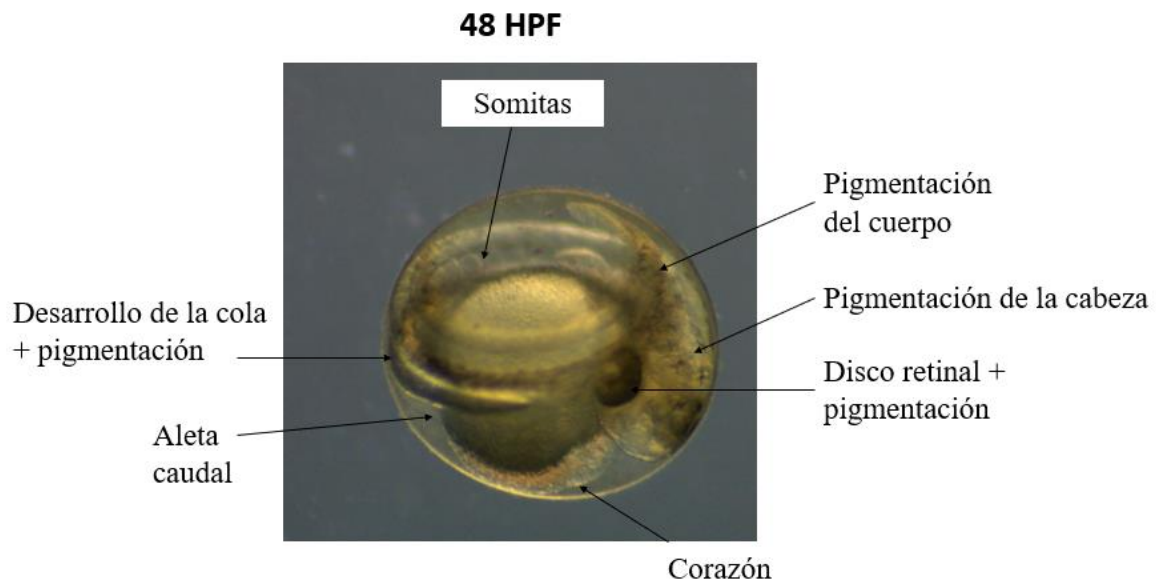


Figura 5. Desarrollo embrionario de *Cyprinus carpio* a las 48 HPF.

72 hpf: las larvas ya eclosionaron, la aleta caudal sigue creciendo (3 puntos), diferenciación de las somitas (1), la pigmentación de los ojos aumenta (3 puntos), así como en la cabeza, cuerpo (1 punto) y cola (1 punto), sistema circulatorio completamente desarrollado (1 punto), apareciendo de las aletas pectorales (1 punto) y protuberancia bucal (1 punto) (Mojer, 2015).

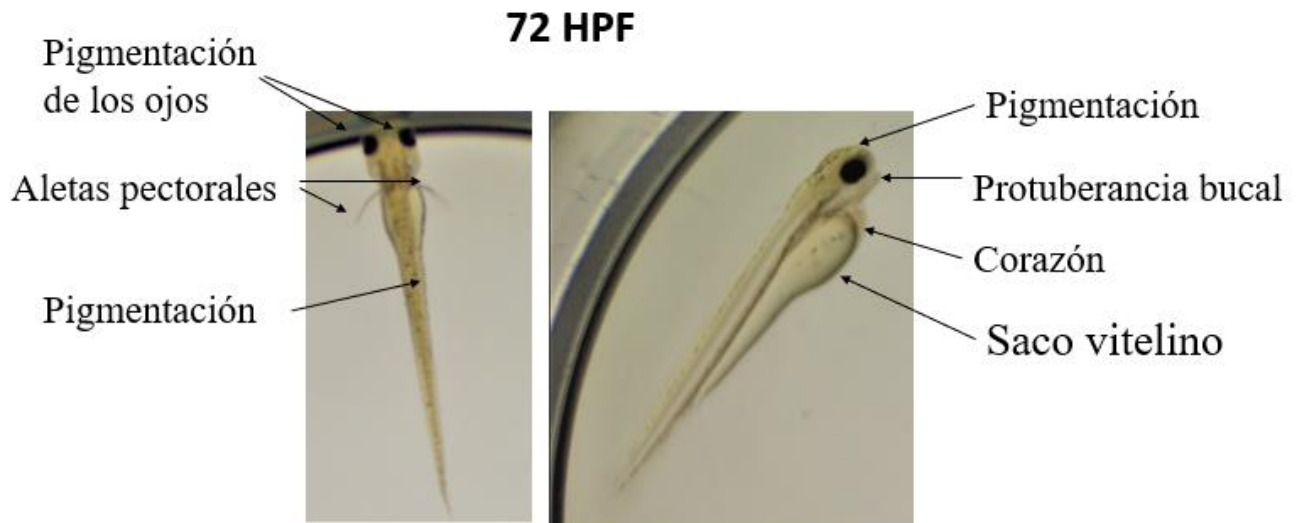


Figura 6. Desarrollo embrionario de *Cyprinus carpio* a las 72 HPF.

96 hpf: las larvas ya eclosionaron, la aleta caudal sigue creciendo (3 puntos), diferenciación de las somitas (1), la pigmentación de los ojos aumenta (3 puntos), así como en la cabeza, cuerpo (1 punto) y cola (1 punto), sistema circulatorio completamente desarrollado (1 punto), apareciendo de las aletas pectorales (1 punto), protuberancia bucal (2 punto) y diferenciación de la vejiga natatoria (Mojer, 2015).

96 HPF

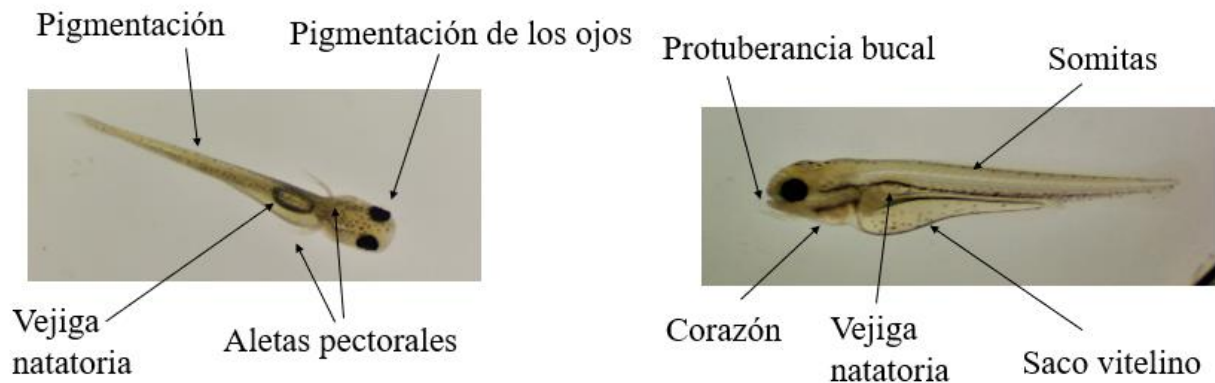


Figura 7. Desarrollo embrionario de *Cyprinus carpio* a las 96 HPF.

Después de la eclosión la larva mide entre 5.23-5.38 mm (promedio de 5.31 mm). Se distinguen dos etapas larvarias: la pre-larva y la post larva, la pre-larva se presenta después de la eclosión hasta el final de la absorción del saco vitelino y posteriormente se denomina periodo post larva (Lászlo *et al.*, 2002; Mojer, 2015).

2.4. Especies reactivas de oxígeno en el desarrollo

El oxígeno juega un papel clave en el metabolismo y es crítico para el desarrollo temprano, es decir, el desarrollo embrionario. Derivados del oxígeno, conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO's), se encuentran las especies como Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2), Oxígeno Singlete (O_2^1), radical superóxido (O_2^{\cdot}) y el radical Hidroxilo (OH^{\cdot}). Las especies reactivas son moléculas o átomos que tienen electrones desapareados en su orbital más externo, pueden tener carga o no y tienden a interactuar con las moléculas cercanas, por lo que posee una gran reactividad química y una vida media muy corta (Camargo *et al.*, 1999).

El metabolismo embrionario se incrementa con el desarrollo, a partir del estado de 2 células aumenta el consumo de carbohidratos por la activación del genoma embrionario. Este consumo de energía y generación de ATP durante el desarrollo embrionario genera radicales libres (Camargo *et al.*, 1999; Brain *et al.*, 2011). Se sabe que las ERO`s participan en varios procesos fisiológicos mediante varias cascadas de señalización celular, actuando como segundos mensajeros, por ejemplo, en los procesos de proliferación y de diferenciación celular, junto con los factores crecimiento. Se ha reportado que las ERO`s participan en el proceso de diferenciación de celular cardiacas (Sauer *et al.*, 2000). Así como en la proliferación de células musculares, fibroblastos, células endoteliales aórticas y diferenciación neuronal (Sauer *et al.*, 2001). También participan en el proceso de apoptosis celular, el cual es crucial durante el desarrollo embrionario (Yang *et al.*, 1998).

Otro radical libre que se ha encontrado durante el desarrollo embrionario es el óxido nítrico (NO) el cual es un mensajero intracelular, participa en procesos como relajación muscular, vasodilatación, señalización celular y estimulación de la respuesta inmune. Y podría estar implicado en la vascularización de los embriones en el periodo de implantación uterina (Gouge *et al.*, 1998).

Durante el desarrollo embrionario, como en el resto de las etapas de desarrollo, deben de controlarse los niveles de ERO`s, por lo que es importante contar con mecanismo de desintoxicación y reparación (Saxèn, 1976). Los embriones son ricos en enzimas protectoras, como son la Superóxido dismutasa (SOD), la Catalasa (CAT) y la Glutación Peroxidasa (GPx), para estar hasta cierto punto protegidos de los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno (Brain *et al.*, 2011). Se ha demostrado que los niveles de defensas antioxidante y procesos de oxidación muestran cambios en diferentes células y tejidos durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario (Sauer *et al.*, 2001).

2.4.1. Estrés oxidativo como mecanismo de teratogénesis

Las ERO's son importantes para el desarrollo embrionario, ya que pueden actuar como mensajeros celulares que modulan procesos como la apoptosis, la activación de factores de transcripción y la diferenciación celular (García-Medina *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando se cambia el equilibrio entre los radicales libres y las defensas antioxidantes durante el desarrollo embrionario, por factores internos o externo se genera estrés oxidativo. El cual podría tener efectos adversos sobre los embriones.

El estrés oxidativo es definido como un estado en el que la oxidación supera los mecanismos antioxidantes en el cuerpo, ya sea por un déficit de las defensas antioxidantes o un incremento de especies oxidantes, causando un desequilibrio y daño celular. Este daño es generado por los radicales libres, que son moléculas inestables, de vida media corta y altamente reactivas, que al tener electrones desapareados reaccionan con los compuestos cercanos. Atacando tejidos biológicos como las membranas, las proteínas y/o al ADN. Para contrarrestar el daño, los organismos aerobios tienen las enzimas antioxidantes como la Superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la Glutación Peroxidasa (GPx) (Corrales y Muñon, 2012; Mañón *et al.*, 2016).

Las especies reactiva pueden inducir daño sobre estructuras como lípidos, proteínas y ADN. La inducción de daño en lípidos genera lipoperoxidación, lo que altera la permeabilidad de la membrana y afectando procesos como la división celular, el transporte de metabolitos y disfunción mitocondrial. El daño mitocondrial se ha relacionado con retraso del desarrollo embrionario, disfunciones metabólicas y apoptosis. También pueden generar oxidación de proteínas, formación de puentes disulfuro y grupos carbonilo; así como modificación estructural de proteínas, lo que puede morder la funcionalidad de la proteína. El daño a lípidos y proteínas puede interferir con vías metabólicas relacionadas con el consumo de energía como la glucosa, causando un agotamiento de ATP (Wells *et al.*, 1997; Guèrin *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2009).

Los radicales libres también pueden generar oxidación y rupturas en las bandas del ADN, lo que podría resultar en la alteración de la transcripción genética e incluso la inducción de mutagénesis. Los embriones cuentan con enzimas que pueden reparar dicho daño, lo que genera una reducción de la citotoxicidad y teratogénesis, pero cuando estos procesos de reparación están dañados, podría resultar en una malformación funcional o estructural, así como la muerte del embrión. Una mayor cantidad de ADN oxidado se correlaciona con un incremento de apoptosis celular (Guèrin *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2009).

Los organismos durante el desarrollo embrionario son especialmente sensibles a los efectos de los radicales libres, principalmente durante el proceso de organogénesis. La inducción de estrés oxidativo durante el desarrollo embrionario, se ha correlacionado con diversas alteraciones, como son incremento de la mutagénesis, retraso en el desarrollo embrión, malformaciones estructurales, incremento de la apoptosis celular y en casos severos la muerte del embrión. Lo que se conoce como embriotoxicidad y teratogénesis (Dennery, 2007; Gelder *et al.*, 2010).

2.5. Embriotoxicidad y teratogénesis

Se define como **embriotoxicidad** al “efecto tóxico que se observa en la progenie entre la concepción y el estadio fetal”, lo que podría manifestarse a través de malformaciones estructurales o funcionales, retraso del crecimiento o incluso la muerte del embrión (Dennery, 2007). Mientras que la **teratogenicidad** consiste en las “malformaciones estructurales irreversibles causadas por la interrupción de un evento normal del desarrollo y puede ser detectada durante la gestación o posterior a este” (Sorborb *et al.*, 2014; Leonart *et al.*; 2015). Por lo tanto, la embriotoxicidad y la teratogenicidad se consideran efectos tóxicos en el desarrollo. Se han empleado comúnmente modelos animales para poder determinar la toxicidad de diversos compuestos durante la embriogénesis (Sorborb *et al.*; 2014).

Un teratógeno es aquella sustancia química o droga que puede causar una malformación específica en los embriones, a través de un mecanismo específico durante un periodo en el que es sensible a estos efectos (Hansen, 2006). Por lo que pueden inducir malformación estructural, disfunción física, alteraciones a la conducta o anomalías genéticas en los fetos (Barile, 2007).

El desarrollo embrionario es una compleja serie de pasos altamente específicos, que estimulan la proliferación oportuna, la diferenciación y la apoptosis para un desarrollo normal. La interrupción de uno o más de estos procesos puede conducir a efectos nocivos, como la inducción de una malformación, principalmente durante la organogénesis (Hansen, 2006).

El desarrollo de varios órganos durante la organogénesis es una serie de pasos estrictamente controlados que conducen a la formación ordenada de diversos tejidos, con un tamaño, forma y función específica. Durante la diferenciación, células similares pueden reconocerse unas con otras, adherirse y formar los diferentes órganos (Saxèn, 1976). Posteriormente algunos tejidos de los órganos embrionarios se eliminan selectivamente por “muerte celular” programada. Considerando que este evento es importante para la morfogénesis de órganos, tanto la muerte excesiva como la inhibición de la apoptosis, pueden generar un desarrollo anormal (Saxèn, 1976).

La susceptibilidad a sufrir teratogénesis, depende de la etapa del desarrollo embrionario donde se da la exposición. Exposición durante el periodo embrionario resulta en muerte embrionaria o defectos de la estructura, si la exposición se hace después del periodo fetal, resulta en defecto del funcionamiento (Wells *et al.*, 2009).

2.5.1. Mecanismos de embriotoxicidad y teratogénesis

El resultado teratogénico es determinado por el sitio de acción del compuesto químico y el estado de desarrollo del órgano blanco, durante la embriogénesis (Saxèn, 1976). Pero de manera general existen 4 sitios de acción para generar teratogénesis, ya sea de manera natural por un gen defectuoso o causado por un agente exógeno, estos son 1) a nivel intracelular, 2) en la superficie celular, 3) en la matriz extracelular y 4) en el entorno fetal, es decir en la relación feto- maternal (Saxèn, 1976).

- 1) El sitio entre el núcleo y la membrana es denominado espacio intracelular y es donde se realizan las funciones metabólicas específicas, con ayuda de diferentes enzimas y proteínas. Si existe un daño puede generar mutaciones en el material genético, puede llevar a la inhibición de una enzima y por lo tanto a una vía metabólica obstruida o se puede alterar los mecanismos de obtención de energía (Saxèn, 1976; Johnson y Kochhar, 1983).

En caso de inhibición de una enzima existen tres posibles consecuencias: la acumulación del metabolito, que no se sintetice un metabolito por el déficit de la enzima o que el metabolito siga una ruta alterna. Existen diversos pasos que pueden ser bloqueados por inhibidores específico, producto de esto se puede generar un efecto puede ser reversible y permite seguir con el desarrollo, o si la función inhibida es vital, el efecto puede ser letal (Saxèn, 1976). También existen hormonas que son necesarias para diferenciar células embrionarias específicas, en caso de ser inhibidas o estimuladas antes de tiempo o más de lo normal pueden generar malformaciones en el embrión (Johnson y Kochhar, 1983)

- 2) Experimentos han mostrado la importancia de la superficie celular, para procesos como reconocimiento celular, agregación, diferenciación e interacciones morfogénicas y migratorias. Por lo que una alteración de la superficie conlleva a defectos embriológicos. Lo que genera una interacción celular dañada o un bloqueo del desarrollo, la indiferenciación celular o incluso la muerte celular (Saxèn, 1976; Johnson y Kochhar, 1983).

- 3) Matriz extracelular En varios tejidos la estructura y función está determinado por la matriz extracelular. Cada matriz tiene una composición única y particular. Por lo que es de esperarse que, si se afecta este tejido, se genere un proceso teratogénico (Saxèn, 1976).
- 4) En mamíferos el desarrollo embrionario está determinado por diferentes factores como factores placentarios, hormonas, factores inmunitarios y factores nutricionales. Cambios en alguno de ellos pueden generar anomalías en el desarrollo (Saxèn, 1976).

Existen otros factores externos que pueden causar teratogénesis. Algunos virus pueden causar infecciones y dañar los tejidos como son citomegalovirus, rubeola, herpes simple y varicela. También se ha visto que factores como la radiación y la temperatura están relacionados con teratogénesis en mamíferos y peces (Johnson y Kochhar, 1983).

2.6. Ensayo de Toxicidad Aguda en Embriones de Pez

El modelo embrionario de pez es uno de los modelos empleados en pruebas de toxicidad, gracias a su tamaño pequeño, rápido desarrollo, su transparencia y el desarrollo parecido a los mamíferos. Lo que permite evaluar parámetros morfológicos del desarrollo y de conducta al poseer desarrollo embrionario transparente (Truong *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2009).

El ensayo de toxicidad aguda en embriones de pez (FET, por sus siglas en inglés) es un método empleado para ver la toxicidad de ciertos compuestos a corto plazo. Donde los embriones se exponen desde huevo recién fertilizado hasta la etapa de eclosión (OECD 236, 2013)

Dentro de las ventajas de este modelo embrionario se encuentran:

- 1) Es un modelo filogenético parecido al humano, desarrollo embrionario parecido entre mamíferos y peces.
- 2) La fertilización es externa lo que facilita el manejo

- 3) Observación de las etapas de desarrollo debido a la transparencia del ovocito.
- 4) Bajo costo (Sogorba *et al*; 2014).

El ensayo tiene una duración de 96 h y se hacen observaciones cada 24 horas, de las variables de efecto: embriones coagulados, falta de formación de somitas, no desprendimiento del brote de la cola del saco vitelino y la falta de latidos cardíacos. Con lo cual se considera que el embrión está muerto (OECD 236, 2013).

3. Justificación

El efluente hospitalario es un foco significativo de contaminación hídrica, ya que contiene diversos compuestos, algunos de los cuales han demostrado ser persistentes y no se encuentran incluidos en las normas mexicanas para aguas residuales; llegando de manera directa o indirecta a los cuerpos de agua en donde podrían generar efectos nocivos sobre los organismos acuáticos.

El presente trabajo pretende hacer una evaluación del riesgo toxicológico de un efluente hospitalario de Toluca, México, sobre ovocitos de *Cyprinus carpio*, mediante los ensayos de teratogenicidad y embriotoxicidad. Con el fin de contar con las bases para orientar a la elaboración de una nueva norma para el manejo de este tipo de descargas, que permita disminuir el impacto ecotóxico de los efluentes hospitalarios.

4. Hipótesis

La exposición de ovocitos de *Cyprinus carpio* a un efluente hospitalario inducirá embriotoxicidad y teratogenicidad dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del efluente y sus componentes químicos.

5. Objetivo general

Evaluar la embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por un efluente hospitalario del estado de México sobre carpa común *Cyprinus carpio*.

5.1. Objetivos específicos

- a) Determinar las características físico-químicas y componentes químicos de un efluente hospitalario de Toluca, Edo. de México
- b) Determinar el índice teratogénico (CL_{50}/CE_{50}) inducido por un efluente hospitalario de Toluca, Estado de México en *Cyprinus carpio*.
- c) Evaluar el daño al desarrollo embrionario producido por un efluente hospitalario de Toluca, Edo. de México sobre *Cyprinus carpio*.
- d) Identificar y cuantificar las malformaciones del desarrollo en *Cyprinus carpio*, inducidas por exposición a un efluente hospitalario de Toluca, Estado de México.

6. Metodología

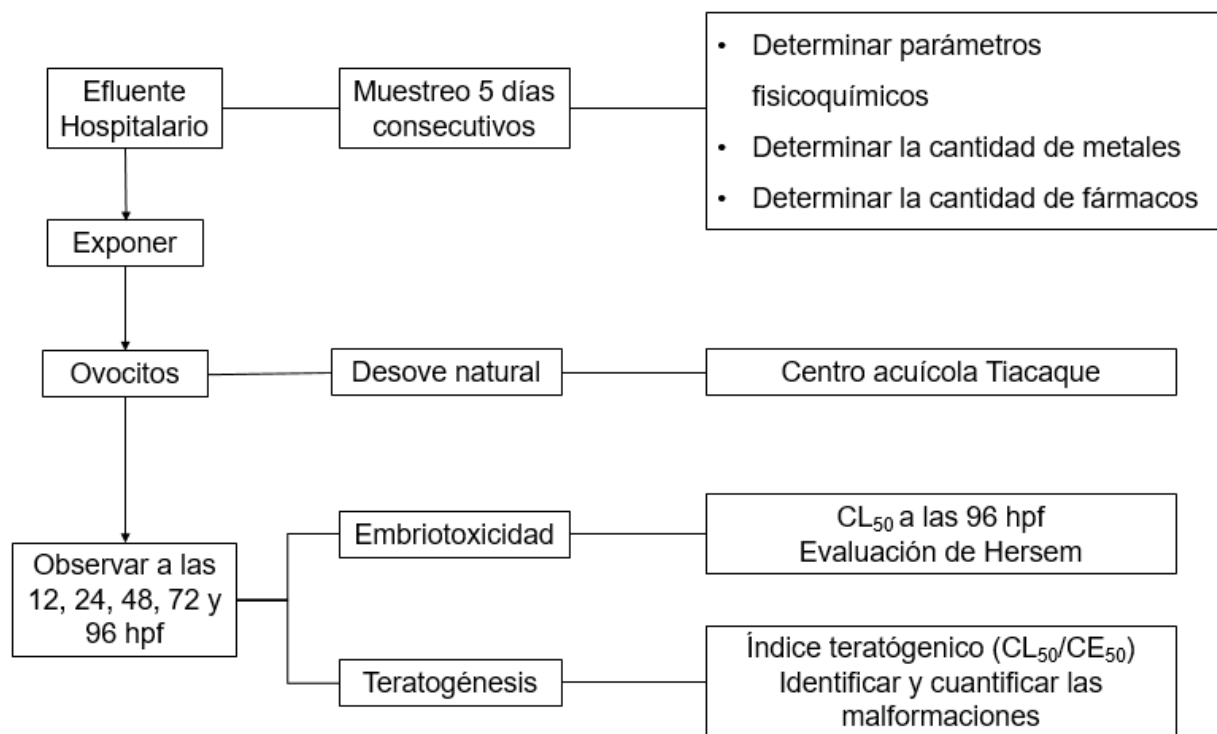


Figura 8. Diseño experimental

6.1. Área de estudio, muestreo y caracterización del efluente

6.1.1. Área de estudio

El hospital en estudio se encuentra ubicado en la Ciudad de Toluca, Estado de México, (Fig. 1). Es un hospital de segundo nivel, que atiende a un millón y medio de pobladores, cuenta con 100 camas, 34 incubadoras, 20 cuneros, cuatro consultorios de ginecología y obstetricia, un consultorio de medicina interna, un consultorio de epidemiología, tres

quirófanos, salas de rayos X, de mastografía y análisis clínico. Atiende en promedio de 200 personas por día.

6.1.2. Muestreo

El muestreo se llevó a cabo en el mes de marzo de 2018, durante una semana, tomando muestra de lunes a viernes, durante el horario de mayor actividad hospitalaria (11:00- 14:00 h). Las muestras fueron tomadas de los registros de agua que fluyen directamente al sistema del alcantarillado municipal, se tomaron muestras simples cada 24 horas con ayuda de un muestreador con frasco volumétrico de polietileno (Tratado previamente con ácido nítrico y agua desionizada) del centro del canal colector a diferentes profundidades, basándonos en la NMX-AA-003-1980, para agua residual, (1980). Se colectaron en contenedores de 20 L, previamente lavados con ácido nítrico al 30% y posteriormente enjuagados con agua desionizada. Las muestras fueron transportadas al laboratorio, protegidas de la luz, etiquetas y almacenadas a 4°C, hasta su análisis fisicoquímico y de micro componentes.

Se obtuvo una muestra compuesta con las diferentes muestras colectadas durante la semana, la cual se mantuvo protegidas de la luz. Una porción del efluente fue utilizada para la caracterización fisicoquímica, otra porción fue utilizada para hacer la caracterización química del efluente (fármacos y metales) y una tercera porción fue empleada para realizar el estudio de embriotoxicidad y teratogenicidad.

6.1.3. Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica se hizo considerando los *Métodos Normalizados para el Análisis del Agua y Aguas Residuales* (APHA, 2017). Los parámetros determinados fueron: temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, pH, cloruros, floreros, dureza, amonio, sólidos suspendidos totales, fósforo total, nitrógeno total, demanda bioquímica de oxígeno y NaClO.

6.1.4. Cuantificación de metales

Para la cuantificación de los metales se basó en la metodología de los *Métodos Normalizados para el Análisis del Agua y Aguas Residuales* (2017) y por González-González *et al.*, (2014). Para ello a 0.5 mL de la muestra del efluente hospitalario se les adicionaron 2 mL de ácido nítrico concentrado. Se realizó la digestión empleando una autoclave a 120°C y 15-lb de presión por un periodo de una hora. Posteriormente las muestras fueron filtradas y diluidas con agua des ionizada. Las lecturas se hicieron en un espectrómetro de absorción atómica Varian AA1475 (Melbourne, Australia). Los resultados fueron interpolados en estándares específicos para cada uno de los metales medidos que fueron As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn.

6.1.5. Cuantificación de grupos farmacéuticos

Fueron identificados 11 fármacos pertenecientes a los grupos de antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, beta lactámicos, antidiabéticos, beta bloqueadores y hormonales. Estos grupos son consistentes con los fármacos que más se prescriben en el hospital en estudio y con los principales servicios médicos de dicha institución.

La determinación se realizó empleando lo estipulado por López-Serna y Petrović, (2012), para este fin la separación cromatográfica se realizó usando un sistema Acquity UHPLC y una columna BEH C18 de fase inversa (2.1 mm de 100 mm, tamaño de partícula de 1.7 mm), ambas de la marca Waters. Las características del método se encuentran estipuladas en Pérez-Alvarez *et al.*, 2018.

6.2 Prueba de toxicidad

6.2.1. Obtención de ovocitos

Se emplearon ovocitos de *Cyprinus carpio* obtenidos por fertilización natural. El proceso de fertilización se llevó a cabo *in situ* en el centro acuícola de Tiacaque, en el Estado de México. Para este proceso, se colocaron en un estanque de fertilización dos hembras y cuatro machos adultos en edad reproductiva. La parte inferior de los estanques fue cubierta con ramas de casuarina para soportar los ovocitos de las carpas y facilitar su cosecha. Para los ensayos de embriotoxicidad y teratogenicidad, sólo se emplearon los ovocitos fecundados analizados con un estereomicroscopio. Posteriormente, los ovocitos fecundados fueron expuestos a diferentes proporciones del efluente hospitalario en estudio en el periodo de blástula a las 3 horas post-fertilización (hpf).

6.2.2. Prueba de embriotoxicidad y teratogénesis

Estas pruebas fueron realizadas siguiendo las directrices establecidas por la OCDE en su guía *Test No. 236: Prueba de Toxicidad Aguda en Embriones de Pez de 2013*, con algunas modificaciones para la carpa común *Cyprinus carpio*. Para las pruebas, se emplearon proporciones del efluente hospitalario en agua testigo (V: V). Las proporciones del efluente hospitalario empleadas fueron las siguientes: 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 y 6 y un sistema testigo, libre del efluente hospitalario, libre de cloro y aireado por 24 horas. Estas proporciones fueron seleccionadas con base en estudios previos realizados en el laboratorio.

Los sistemas consistieron en ovocitos fertilizados seleccionados aleatoriamente que fueron colocados en microplacas de 24 pozos, se colocó un ovocito por cada pozo hasta formar lotes de 20 ovocitos, y las pruebas se realizaron por triplicado. Estos sistemas fueron empleados para cada proporción del efluente.

Las microplacas se mantuvieron por cinco días a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, con ciclos de luz-oscuridad natural en el laboratorio de Toxicología de la Universidad Autónoma del Estado de México. Se realizaron observaciones empleando el microscopio estereoscópico a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf, tomando fotografías y empleando el programa Zeiss para Windows.

6.2.3. Validez de la prueba

Para garantizar la trazabilidad de los resultados, los lotes de huevos sólo se emplearon si la tasa de fertilización era $\geq 90\%$. También es importante mencionar que la prueba se consideró válida si los grupos controles no mostraron más del 10% de efectos teratogénicos letales a las 96 hpf. Además de mantuvo la temperatura y el pH constante.

6.2.4. Determinación de la CL₅₀ y EC₅₀

La determinación de la CL₅₀ de ovocitos se realizó a las 96h se emplearon los sistemas arriba mencionados, para ello se observaron los ovocitos en el microscopio estereoscópico. Se contaron los ovocitos vivos y muertos a lo largo de las 96 horas de exposición, se consideró la letalidad cuando se presentaron ovocitos coagulados o no se detectaron latidos del corazón.

La determinación de la CE₅₀ en ovocitos se realizó empleando los sistemas arriba mencionados, para ello se observaron los ovocitos en el microscopio estereoscópico durante las 96 h de la exposición y se cuantificaron los ovocitos con alteraciones en el desarrollo embrionario y con desarrollo normal. Para ellos nos basamos en el desarrollo embrionario descrito por Kimmel *et al.*, 1995 y se comparo con los organismos controles.

Para la determinación de la CL₅₀ y la CE₅₀ mediante el 'Metodo Trimmed de Spearman-Karber (Hamilton *et al.*, 1977) se empleó el software US-EPA. Se determinó la CL₅₀ y la CE₅₀ con sus límites de confianza al 95% ($p < 0.05$).

6.2.5. Cálculo del índice teratogénico index (TI)

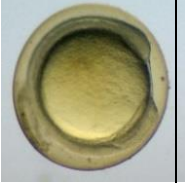
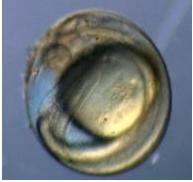
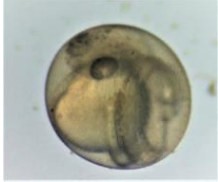


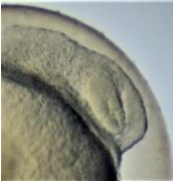
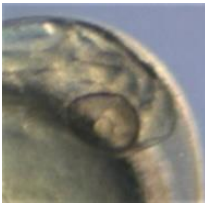



Para determinar el potencial teratogénico del efluente hospitalario, se calculó el índice teratogénico, el cual es el resultado del cociente entre la CL₅₀ y CE₅₀ de malformaciones. Si el IT de una sustancia es mayor que 1, la sustancia se considera teratogénica y si la IT está por debajo de 1, la sustancia produce principalmente efectos embrioletales (Weigt *et al.*, 2011)

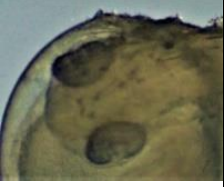











6.2.6. Evaluación de la embriotoxicidad

Para la evaluación de la embriotoxicidad, se emplearon los sistemas mencionados previamente. Los embriones vivos fueron observados en el microscopio a las 12, 24, 48, 72 y 96 h. Las alteraciones al desarrollo embrionario fueron registradas de acuerdo al sistema de puntuación establecido por Kimmel *et al.*, (1995) y Hermsen *et al.*, (2011) con modificaciones mostradas en la **Tabla 1**.

Los datos fueron analizados mediante una prueba t de Student (una cola) para determinar las diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles ($p < 0.05$).

Tabla 1. Puntuación de morfología general (GMS, por sus siglas en inglés), basado en Hermesen *et al.*, 2011 con algunas modificaciones para *Cyprinus carpio*

	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
<i>Desprendimiento de la cola</i>	 0	 2	 3	 3 + 1 por pigmentación	 3 + 1 por pigmentación
<i>Formación de somitas</i>	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
<i>Desarrollo del ojo</i>	 1	 2	 2 + 1 por pigmentación	 2 + 1 por pigmentación	 2+ 1 por pigmentación
<i>Movimiento</i>	No = 0	Si = 1	Si = 1	Si = 1	Si = 1
<i>Latido de corazón</i>	No = 0	Si = 1	Si = 1	Si = 1	Si = 1
<i>Circulación sanguínea</i>	No = 0	No = 0	Si = 1	Si = 1	Si = 1

<i>Pigmentación cabeza y cuerpo</i>	0	0	 1	 1	 1
<i>Pigmentación de la cola</i>	0	0	 1	 1	 1
<i>Aletas pectorales</i>	0	0	0	 1	 1
<i>Protuberancia bucal</i>	0	0	0	 1	 2
<i>Eclosión</i>	No = 0	No = 0	No = 0	 Si = 1	 Si = 1
<i>Puntuación total</i>	2	7	12	16	17

6.2.7. Evaluación de la teratogénesis

Para la evaluación de la teratogénesis se emplearon los sistemas mencionados previamente. Los embriones vivos fueron observados en el microscopio a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf. Con las alteraciones embrionarias y malformaciones teratogénicas identificadas se elaboró un histograma de frecuencia. Las alteraciones encontradas fueron: retraso del desarrollo; retraso del proceso de eclosión, deformación de las aletas, hipopigmentación, hemorragia en la cabeza, hemorragia en la cola, hemorragia en el saco vitelino, severos; modificación de la notocorda, malformación de la cabeza, malformación del corazón, hiperplasia de la boca, malformación de los otolitos, malformación de la cola, edema pericárdico, raquitismo, escoliosis, deformación del saco vitelino y edema del saco.

7. Resultados

7.1. Caracterización físico química y de los microcontaminantes presentes en el efluente hospitalario

7.1.1. Características fisicoquímicas del efluente hospitalario

En la tabla 2, se muestran los valores de la media y las desviaciones estándar de las características fisicoquímicas del efluente hospitalario y su contraste con las normas nacionales que establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales. Se observa que las características fisicoquímicas evaluadas: Temperatura, pH, Cloruros, Fluoruros, Dureza, Sólidos suspendidos totales, Fósforo total, Nitrógeno total y Demanda bioquímica de Oxígeno están dentro de los valores estipulados en las normas mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1996. Mientras que las características: Oxígeno disuelto, Conductividad, Amonio e NaClO no están contempladas dentro de las normas antes mencionadas.

Tabla 2. Características fisicoquímicas del efluente hospitalario

Parámetro fisicoquímico	Efluente hospitalario evaluado	Límites máximos permisibles	
		NOM-001- SEMARNAT-1996	NOM-002- SEMARNAT- 1996
Temperatura (°C)	15.3 ± 0.5	40	40
Oxígeno disuelto (mg/L)	13.6 ± 0.3	N.E.	N.E.
Conductividad (µS/cm)	7.3 ± 0.7	N.E.	N.E.
pH	8.1 ± 0.2	6.5 – 8.5	6 - 9
Cloruros (mg/L)	203 ± 4	250	N.E.
Fluoruros (mg/L)	6.7 ± 0.9	0 -15	N.E.
Dureza (mg/L)	2.45 ± 0.1	500	N.E.
Amonio (mg/L)	0.97 ± 0.2	N.E.	N.E.
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	42 ± 1.2	60	40-60
Fósforo total (mg/L)	8.3 ± 0.8	10	10
Nitrógeno total (mg/L)	19 ± 0.5	25	N.E.
Demanda bioquímica de oxígeno (mg/L)	43 ± 0.3	60	40 - 60
NaClO (mg/L)	1.3 ± 0.1	N.E.	N.E.

N.E. = No establecido en la norma

7.1.2. Caracterización de los metales presentes en el efluente hospitalario

En la tabla 3, se presentan los datos obtenidos de la cuantificación de los metales presentes en el efluente hospitalario y su contraste con los límites establecidos en las normas mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1996. Los valores de los metales As, Cd, Cu, Cr, Ni y Zn se encuentran dentro de los límites establecidos en las normas. Mientras que Hg como Pb están por arriba de lo estipulado en la normatividad

mexicana, en el caso de Hg presento lo doble de la concentración permitida en la NOM.002 y 3.7 veces más en contraste con la NOM- 001 y en el caso de Pb presenta 0.078 mg/L más en contraste con los límites de la norma NOM-001.

Tabla 3. Metales detectados en el efluente hospitalario

Metal	Concentración (mg/L)	Límites de cuantificación		Límites máximos permisibles	
		LD (mg/L)	LC (mg/L)	NOM-001- SEMARNAT- 1996	NOM-002- SEMARNAT- 1996
As	0.017 ± 0.001	2.65	5.39	0.2	0.75
Cd	0.052 ± 0.001	1.82	6.23	0.2	0.75
Cu	0.34 ± 0.001	2.48	5.23	6.0	15
Cr	0.63 ± 0.02	1.73	5.28	1.0	0.75
Hg	0.037 ± 0.001 *	0.89	3.45	0.01	0.015
Ni	0.67 ± 0.001	1.12	4.67	4	6
Pb	0.478 ± 0.03 *	0.94	4.17	0.4	1.5
Zn	0.478 ± 0.02	1.03	6.78	20	9

* Excede los límites de las normas mexicanas, LD: Limite de detección; LC: Limite de cuantificación.

7.1.3. Caracterización de los fármacos presentes en el efluente hospitalario

En la tabla 4, se presentan los datos obtenidos de los 11 medicamentos, como microcontaminantes emergentes determinados en el efluente hospitalario. Este tipo de microcontaminantes no está incluido en la normatividad mexicana. Se encontraron valores que van desde 0.018 µg/L para el caso del 17 β estradiol, hasta concentraciones de 4.01 µg/L para la penicilina. Los 3 fármacos que presentaron la mayor concentración son: penicilina con 4.01 µg/L, paracetamol con 2.84 µg/L, metoprolol con 2.8 µg/L y glibenclamida 2.03 µg/L.

Tabla 4. Concentración de los Fármacos encontrados en el efluente hospitalario

Tipo de Fármaco	Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)	LC ($\mu\text{g/L}$)
AINEs	Diclofenaco	0.60 ± 0.08	0.02	0.08
	Ibuprofeno	0.72 ± 0.12	0.01	0.05
	Naproxeno	1.83 ± 0.30	0.75	5.82
	Paracetamol	2.84 ± 0.09	0.38	1.56
β -lactamicos	Penicilina G	4.01 ± 0.30	0.12	0.40
	Penicilina V	0.56 ± 0.10	0.22	0.74
Antidiabeticos	Glibenclamida	2.03 ± 0.08	13.54	45.13
	Metformina	1.42 ± 0.06	0.54	2.51
β -bloqueadores	Atenolol	0.023 ± 0.002	0.04	0.12
	Metoprolol	2.8 ± 0.16	0.12	0.39
Hormonas	17 β estradiol	0.018 ± 0.001	0.01	0.05

LD: Limite de detección; LC: Limite de cuantificación; AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos.

7.2. Datos de embrioletalidad y teratogenicidad inducido por el efluente hospitalario

7.2.1. CL_{50} , CE_{50} e índice teratogénico a las 96 hpf

En la tabla 5 se muestran los porcentajes de mortalidad y de malformaciones que se obtuvieron después de la exposición a diferentes proporciones del efluente hospitalario. Y los cuales fueron empleados para determinar CL_{50} y CE_{50} con el programa Spearman-Kärber así como sus intervalos de confianza al 95% ($p < 0.05$). El índice teratogénico se determinó tomando en cuenta la relación entre CL_{50}/CE_{50} de malformaciones, el cual fue de 1.46 y por lo que el efluente hospitalario en estudio fue considerado como teratogénico.

Tabla 5.- Porcentaje de mortalidad y malformaciones en ovocitos de *Cyprinus carpio* expuestos a efluente hospitalario

Proporción de efluente (%)	Número de embriones expuestos	Mortalidad (%)	Malformaciones (%)
0	60	0	0/60 (0)
3	60	16/60 (0.26)	25/60 (0.42)
3.5	60	18/60 (0.30)	27/60 (0.45)
4	60	20/60 (0.33)	27/60 (0.45)
4.5	60	23/60 (0.38)	31/60 (0.52)
5	60	25/60 (0.41)	37/60 (0.62)
5.5	60	28/60 (0.46)	44/60 (0.73)
6	60	35/60 (0.58)	53/60 (0.88)
		LC50 = 5.654 CI = [4.990-7.474]	EC50=3.852 CI = [3.479-4.149]
Índice teratogénico 1.467			

7.2.2. Efectos tóxicos inducidos por el efluente hospitalario (normales, muertos y malformaciones)

En la Fig. 9 se muestran los datos de los ovocitos expuestos al efluente hospitalario y los diferentes porcentajes de ovocitos que se mantuvieron normales, los que presentaron alguna alteración teratogénica y los que murieron. Se puede observar que los ovocitos con teratogénesis estuvieron entre un 20 y 34%, y los muertos entre 17 y 29%. Es importante resaltar que, en las proporciones más altas del efluente hospitalario, se incrementó el número de muertes, porque las alteraciones teratogénicas pusieron en peligro la integridad del ovocito. En el control, el desarrollo de los ovocitos se mantuvo normal hasta las 96 hpf y no se presentó ninguna muerte ni alteraciones teratogénicas.

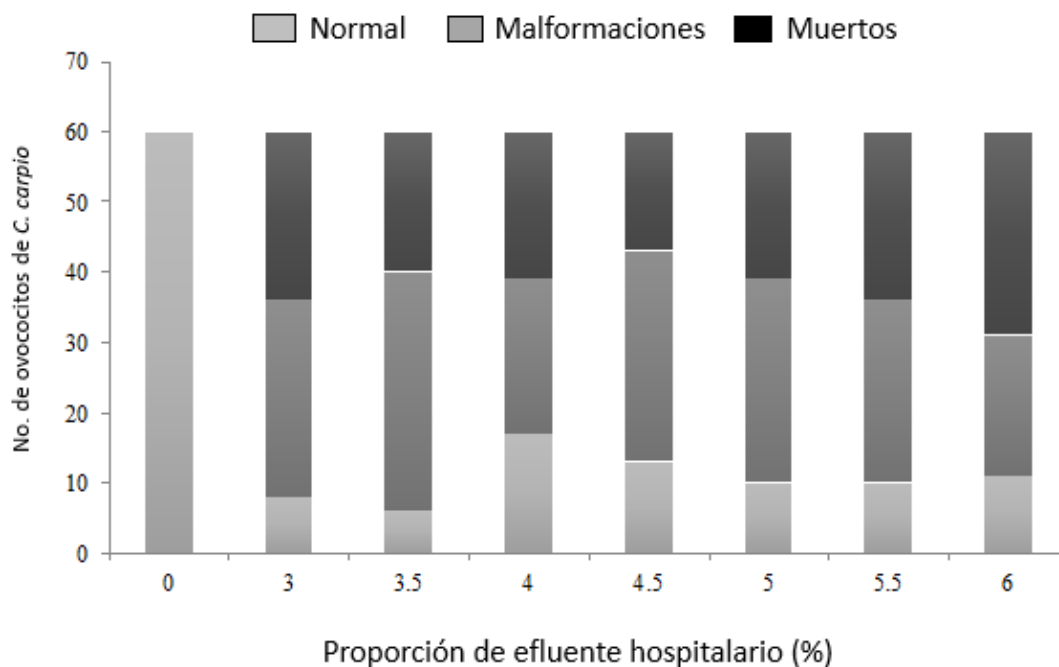


Figura 9. Número de ovocitos normales, con teratogénesis y muertos a las 96 hpf, expuestos a diferentes proporciones del efluente hospitalario.

7.2.3. Embriotoxicidad inducida por el efluente hospitalario

En la Fig. 10 se puede observar el puntaje obtenido a cada una de las proporciones del efluente hospitalario evaluado a los diferentes tiempos de exposición empleados, como se puede observar en el caso del control el puntaje obtenido fue el máximo en cada tiempo de exposición dado que el desarrollo del ovocito fue normal, sin embargo como se observa al ir incrementando la proporciones de efluente hospitalario el puntaje fue disminuyendo debido a todas las alteraciones presentadas en el desarrollo embrionario, en la proporción del 6% el decremento en el puntaje fue más drástico. También se observa que a medida que transcurre el tiempo la diferencia entre puntaje de los ovocitos expuestos al efluente hospitalario y el grupo testigo es más significativo.

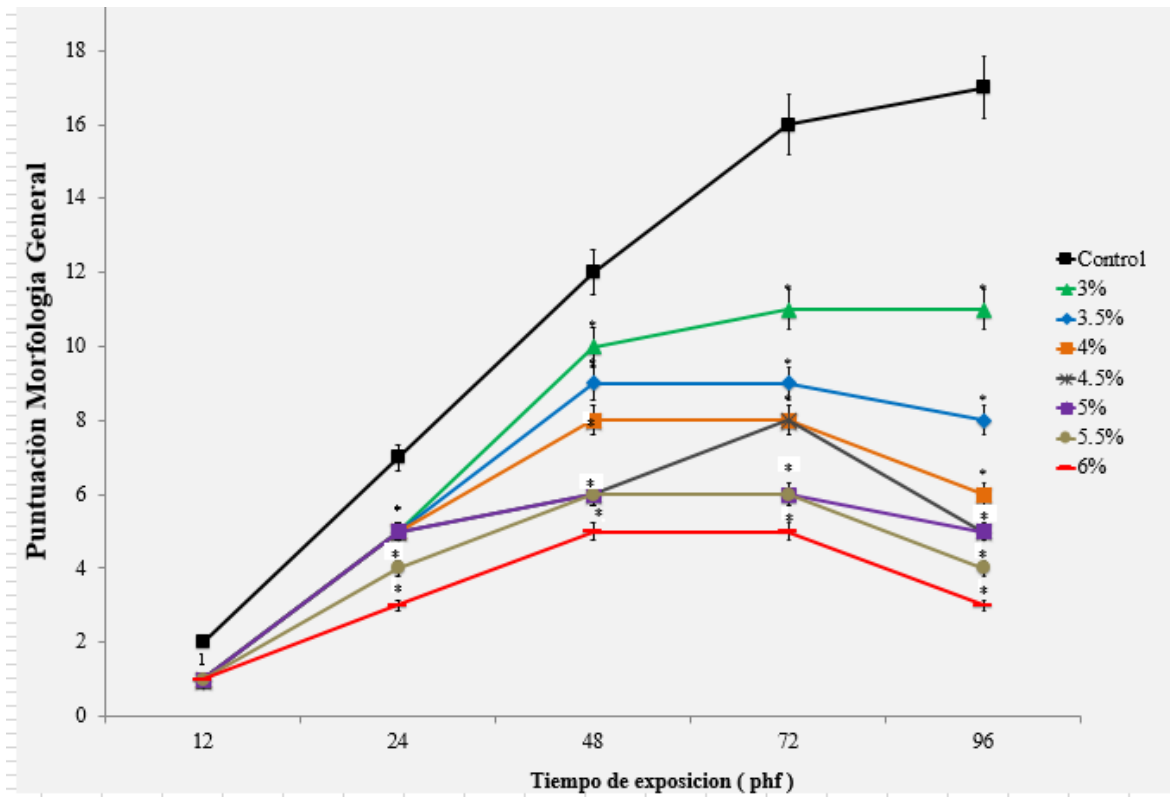


Figura 10. Curva de Puntuación a la morfología general a las diferentes horas post fertilización en ovocitos expuestos a efluente hospitalario

7.2.4. Principales malformaciones inducidas por la exposición de ovocitos de *Cyprinus carpio* a efluente hospitalario

En la Fig. 11 se muestra la frecuencia de las alteraciones teratogénicas observadas en los ovocitos de *Cyprinus carpio* expuestos a diferentes proporciones del efluente hospitalario, como se puede observar las más frecuentes fueron: deformación del saco vitelino, escoliosis, modificación de la estructura de la notocorda, malformación de la cola, deformación de las aletas e hiperplasia de la boca. El número de malformaciones estuvo entre 20-34%, poniendo el riesgo la integridad del ovocito de la carpa conforme incrementaba el tiempo de exposición.

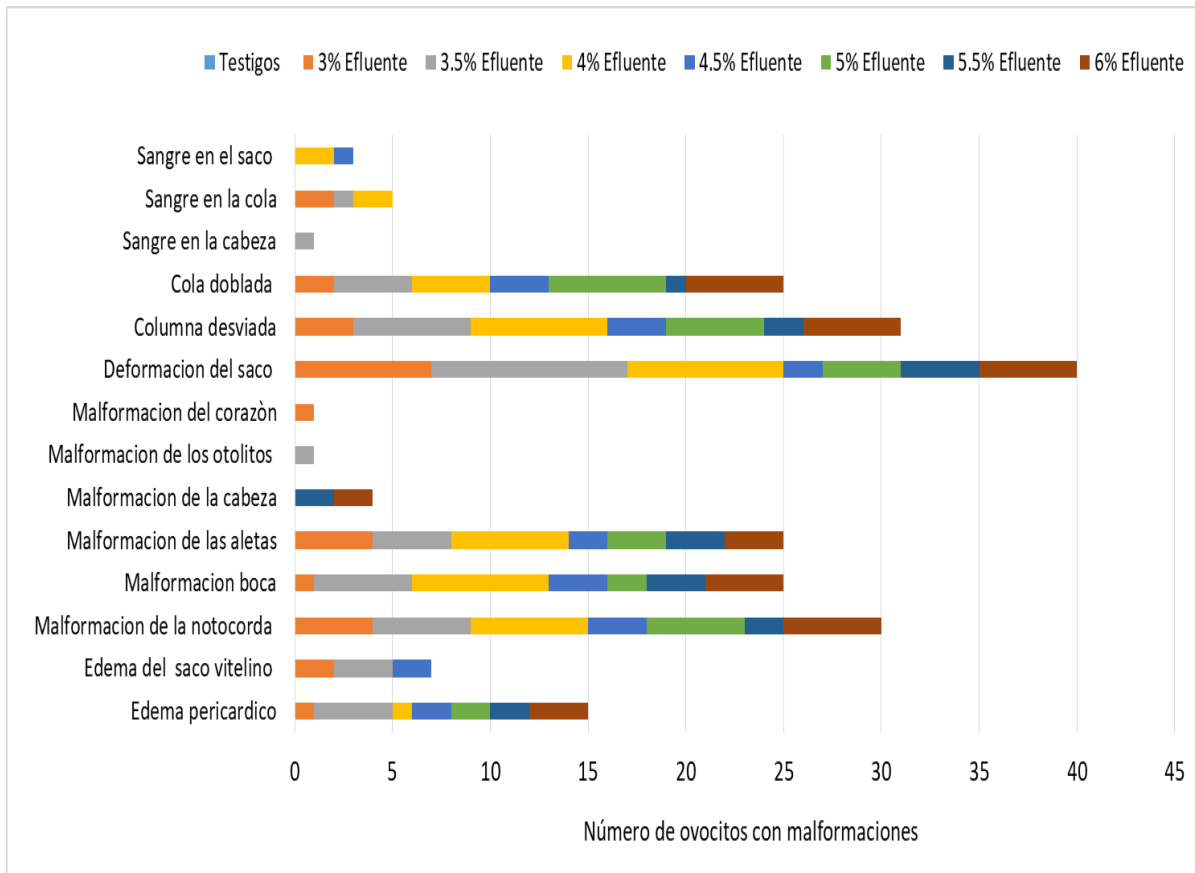
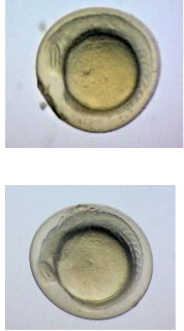

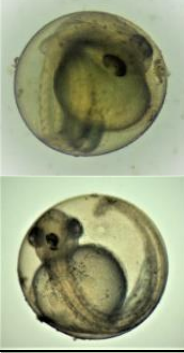


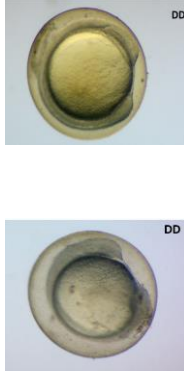

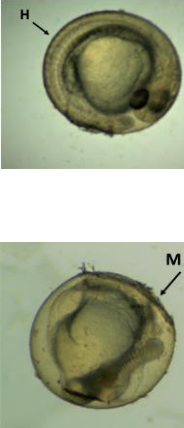
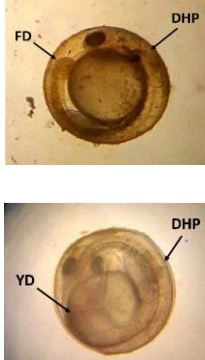
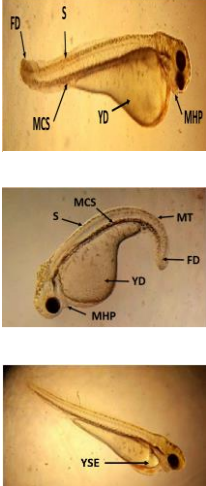
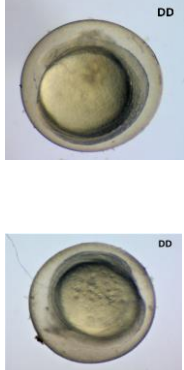
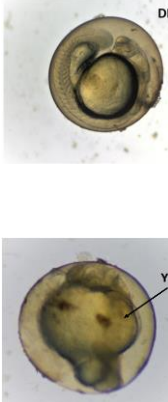
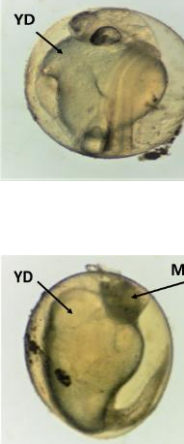
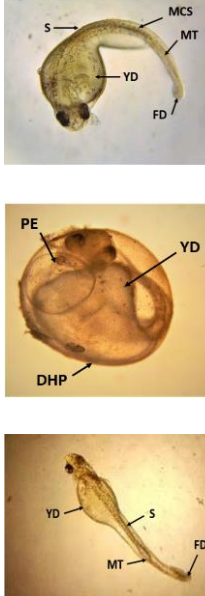
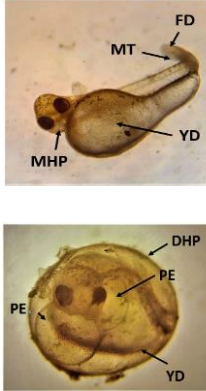

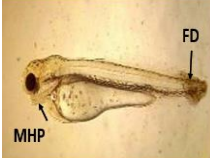
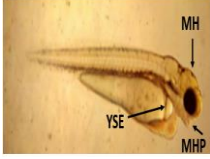

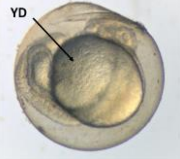
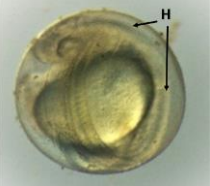
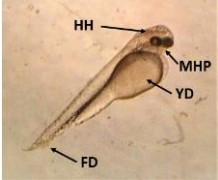

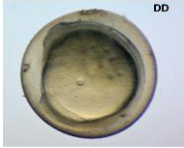


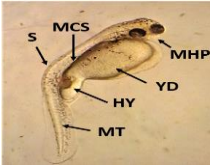
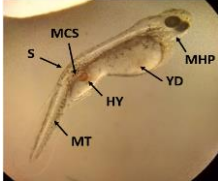

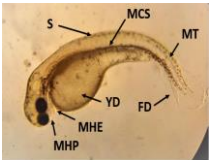
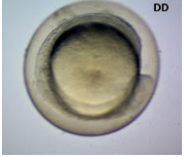

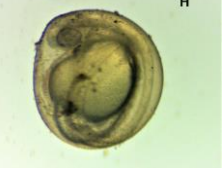
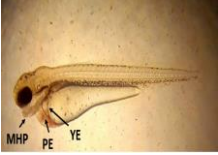
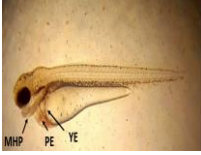
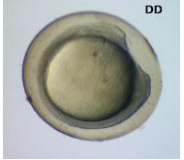





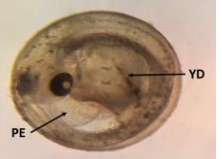
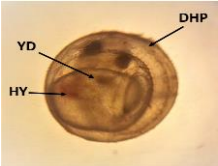
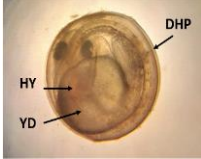


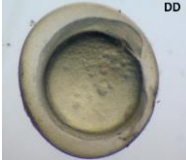




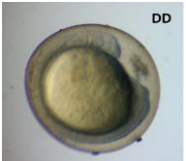
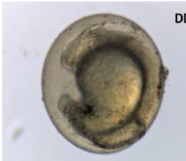

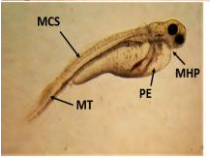
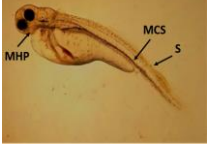
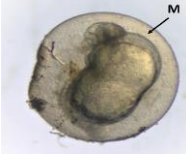


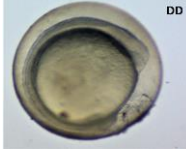




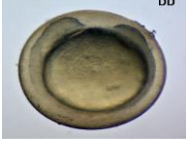
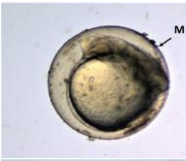
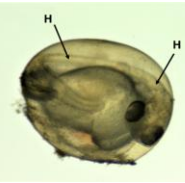
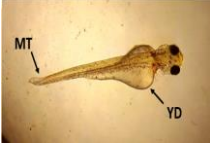
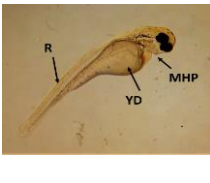
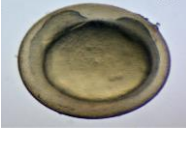
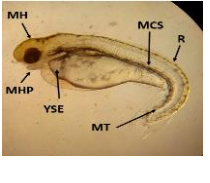



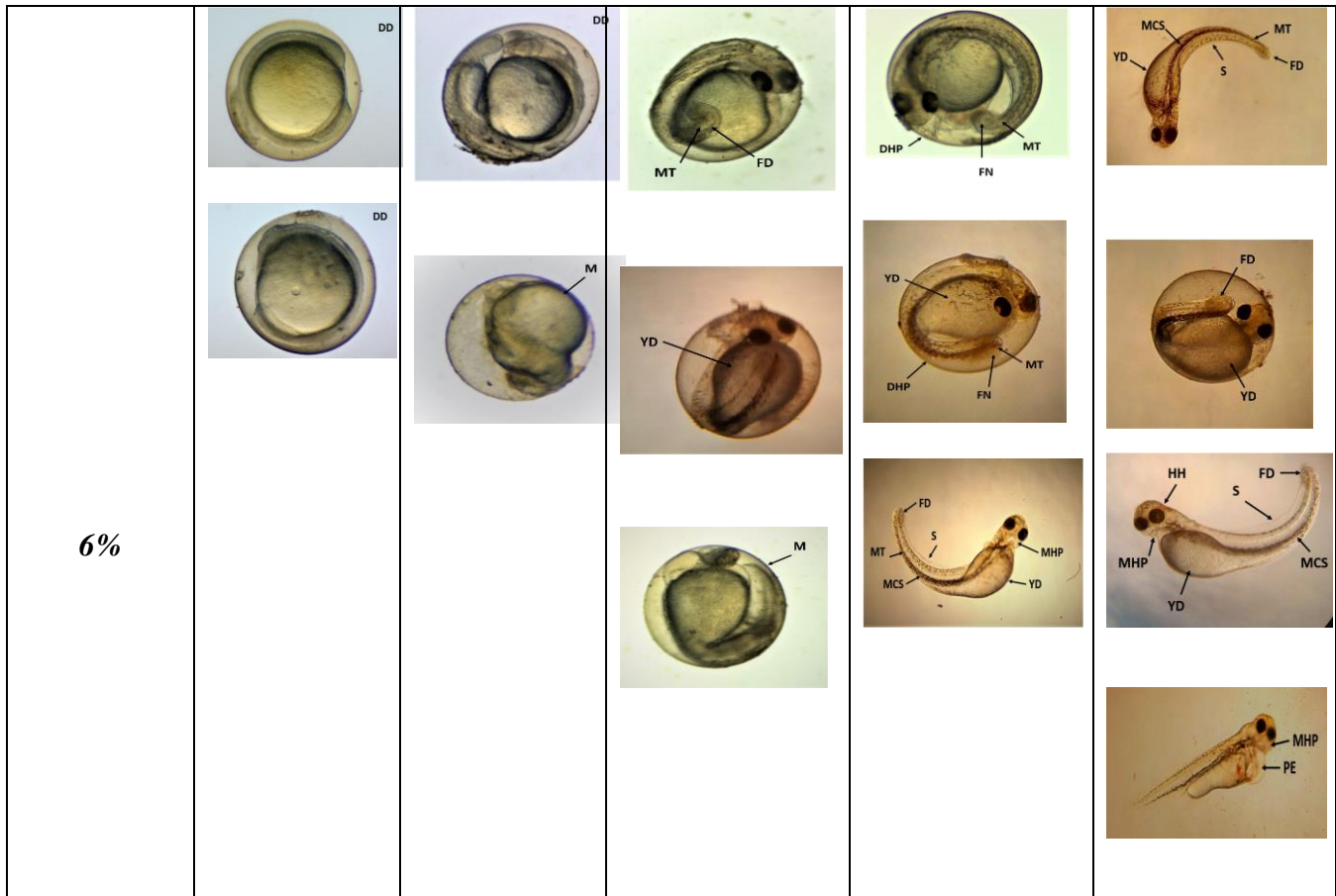
Figura 11. Malformaciones inducidas por la exposición de ovocitos de *Cyprinus carpio* a diferentes proporciones del efluente Hospitalario.

En la **Fig. 12**, se observan las diferentes malformaciones que se presentaron en los ovocitos de la carpa común después de la exposición al efluente hospitalario. En el control se observa el desarrollo de los ovocitos de la carpa a las diferentes hpf. Los organismos expuestos se compararon con el sistema control, teniendo a las 72 y 96 hpf las alteraciones más severas, siendo estas: malformaciones esqueléticas escoliosis, alteraciones de la notocorda, hiperplasia de la boca, y edema pericárdico. También se observa la presencia de varias estructuras morfológicas alteradas en el mismo individuo, principalmente en las proporciones más altas y en los últimos tiempos de desarrollo, estas alteraciones fueron muy severas en algunos ovocitos ocasionando su muerte.

Proporción de efluente hospitalario	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
<p>0% <i>(Control)</i></p>					
<p>3%</p>					
<p>3.5%</p>					

					 
4%					
					
					
4.5 %					
					
					

					
5%					
					
					
5.5%					
					
					
					



Por sus siglas en inglés: DD = Retraso del desarrollo; **DHP**= Retraso en el proceso de eclosión;

FD =Deformación de la aletas; **H** = Hipopigmentación; **HH** = Hemorragia en la cabeza; **HT** = Hemorragia en la cola; **HY** = Hemorragia en el saco vitelino; **M** = Severas; **MCS** =Modificación de la estructura de la corda; **MH** = Malformación en la cabeza; **MHE** =Malformación en el corazón; **MHP** = Hiperplasia bucal; **MO** =Malformación de los otolitos; **MT** = Malformación de la cola; **PE** = Edema Pericárdico; **R** =Raquiquismo; **S** = Escoliosis; **YD** = Deformación del saco vitelino; **YSE** = Edema del saco vitelino.

Figura 12. Malformaciones en los ovocitos de la carpa común inducidas por la exposición al efluente hospitalario a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf, por diferentes proporciones de efluente hospitalario.

8. Discusión

Una de las principales razones por la que es necesaria la evaluación toxicológica que generan los efluentes hospitalarios sobre los organismos acuáticos, es que la liberación de los compuestos que contienen estas agua residuales van directamente al alcantarillado municipal (Langford y Thomas, 2009) y a los cuerpos de agua, donde los organismos acuáticos están siendo expuestos contantemente y generan efectos deletéreos sobre estas especies.

El presente estudio pretende aportar información acerca de los riesgos tóxicos de este tipo de descargas y su impacto ecológico; ya que hay pocos estudios; así como contar con la base para proponer algunas alternativas para evitar el deterioro ecológico que se está generando al medio ambiente.

El hospital en estudio no cuenta con una planta de tratamiento de sus aguas residuales, y como única medida de tratamiento emplean la cloración por ser un método fácil y económico. Sin embargo hay diversos reportes que han referido que hay un incremento en la toxicidad en diversas especies acuáticas después del tratamiento de aguas residuales por el método de cloración (Gopal *et al.*, 2007; Pignata *et al.*, 2012).

En los resultados de la **caracterización fisicoquímica** del efluente hospitalario, se observa que la mayoría de las propiedades fisicoquímicas se encuentran dentro de la normatividad de México, los parámetros que no están contemplados en las normas fueron oxígeno disuelto, conductividad, amonio y NaClO. No obstante, los valores de oxígeno disuelto, pH, conductividad y amonio encontrados en el efluente son apropiados para la supervivencia de *C. Carpio* y no han sido relacionados con alteraciones fisiológicas o bioquímicas en organismos acuáticos (Lászlo *et al.*, 2002; Postma *et al.*, 2002).

El hipoclorito de sodio NaClO es usado comúnmente como desinfectante de hospitales, en este estudio se encontraron concentraciones de 1.3 mg/L de NaClO. En la literatura hay reportes de que concentraciones entre 0.55 mg/L y 1.24 mg/L son capaces de generar

efectos genotóxicos en eritrocitos de *Cyprinus carpio* (Buschini *et al.*, 2004). El NaClO resulta tóxico para organismo acuáticos como microcrustáceos, peces y moluscos en concentraciones de hasta 1 mg/L, además afecta el fitoplacton en concentraciones de entre 0.05 mg/L y 0.15 mg/L (Emmanuel *et al.*, 2005). Cuando el NaClO entra en contacto con la materia orgánica pueden reaccionar, creando compuestos orgánicos halogenados (AOX), triclorometano, compuestos organoclorados alifáticos y aromáticos; los cuales son tóxicos y genotóxicos para organismos acuáticos (Magdaleno *et al.*, 2014; Emmanuel *et al.*, 2005). Los medios de contraste de rayos X también dan lugar a la formación de compuestos AOX, siendo que el hospital cuenta con estudios de radiodiagnóstico, no se descarta la posibilidad de formación de estos compuestos. Los AOX son tóxicos para peces y otros organismos acuáticos en bajas concentraciones. Muchos son persistentes y tienden a bioacumularse (Carraro *et al.*, 2016; Boillot *et al.*, 2008).

Al realizar la caracterización química de los **microcontaminantes** presentes en el efluente hospitalario, se observa la presencia de varios metales, los cuales se encuentran dentro de los límites permisibles por las normas mexicanas, excepto el Hg y el Pb. Los residuos de mercurio podrían generarse debido al instrumental utilizado en la clínica, sales de mercurio empleados en la desinfección, así como a compuestos de la clínica de odontología presente en dicha unidad médica. (Paz *et al.*, 2008).

En este estudio se encontró 0.037 mg/L de Hg, Devlin y Mottet, 1992, reportan que la exposición de huevos de salmón a una concentración inferior de 29 µg/L, es capaz de generar daño teratógeno y embriotóxicos como son alteraciones de la notocorda y edema esqueleto muscular en embriones de 48 días post fertilización (dpf) La exposición a 0.01–1.00 mg/L de Hg causó la eclosión prematura en 34% de las larvas del pez Medaka, un incremento del 28%- 50% en la muerte y la formación de larvas con cola doblada (Ismail y Yusof, 2011).

El plomo forma parte de diversos compuestos como son tuberías, instalaciones eléctricas, pinturas, baterías y en las paredes de los salones de diagnóstico y tratamiento radiológico (Poma, 2008), por lo que la concentración de Pb encontrada fue de 0.478 mg/L. Álvarez,

2011 reporta que la exposición de huevos de *Danio rerio* a 0.5 ppm de Pb, genero 70% de malformaciones, como son escoliosis, lordosis, hipertrofia de las aletas, hemorragia cefálica y edema pericárdico.

Metales como As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn estuvieron presentes en concentraciones entre 0.017 y 0.478 mg/L. Algunos estudios han demostrado que los metales tienen la capacidad de producir embriotoxicidad y teratogenicidad en organismos acuáticos. Un estudio realizado por Pérez-Alvarez *et al.*, (2018) demostró, que los mismos metales presentes en el efluente hospitalario en estudio durante 2017 indujeron estrés oxidativo, embriotoxicidad y teratogenicidad, en *Lithobates catesbeianus* y *Xenopus laevis*. Se ha demostrado que concentraciones entre 30 µg/L a 88.2 mg/L de Cr son capaces de inducir alteraciones entre las que destacan citotoxicidad, afectación del sistema inmune, daño al ADN y alteraciones embrionarias en especies como *Labeo rohita*, *Pimephales promelas*, *Salmo gardnerii*, *Cyprinus carpio*, *Oreochromis nilitica*, entre otras (Bakshi y Panigrahi, 2018).

En el efluente hospitalario se encontraron principalmente AINEs en un rango de concentración de 0.60 a 2.84 µg/L, dentro los que destacan diclofenaco (DCF) estudio realizado por Xia *et al.*, (2017) demostró que exposiciones a 5.50 y 500 µg/L de diclofenaco e ibuprofeno produjeron retraso en la eclosión de embriones, así mismo afectan la actividad motora de las larvas de pez zebra. El ibuprofeno (IBP) a concentraciones de 0.01 and 0.1 µg/L reduce el desarrollo normal en la larva pluteus y a concentraciones de 5 µg/L se observa una permanencia en el estadio de blástula y gástrula (Aguirre-Martínez, *et al.*, 2015).

En el efluente hospitalario evaluado, también se encontraron penicilina G y V, antidiabéticos como la glibenclamida y metformina, β-bloqueadores como atenolol y propranolol y hormonales como 17-β-estradiol. Los 3 fármacos que se presentaron en mayor concentración fueron: penicilina con 4.01 µg/L, paracetamol con 2.84 µg/L y metoprolol con 2.8 µg/L, los cuales coinciden con la literatura como los fármacos de mayor consumo y presencia constante en efluentes hospitalarios (Helwig *et al.*, 2013).

El amplio uso de **antibióticos** ha provocado una constante disposición de ellos en el ambiente, provocando efectos deletéreos sobre los organismos. La exposición a 0-10 ppm de amikacina generó una reducción en las aletas de *Danio rerio*, de manera dosis dependiente (Cheng *et al.*, 2012).

Hermesen *et al.*, (2011), refieren diversos efectos por exposición a carbamazepina, diclofenaco y metoprolol, a concentraciones de 30.6, 1.5 y 12.6 mg/L respectivamente, destacando retardo en el crecimiento, retraso en la eclosión, deformación de cola y saco vitelino, y escoliosis en embriones de *Danio rerio*. Los β -bloqueadores como el metoprolol (encontrado en este estudio) han sido asociados a disminución de la frecuencia cardíaca, retraso en la eclosión y aumento en la mortalidad de *Danio rerio* en concentraciones de 8 y 16 mg/L (Sun *et al.*, 2014).

El 17- β -estradiol se agrupa dentro de los disruptores endocrinos, los cuales se encuentran en la lista prioritaria de contaminantes. El 17- β -estradiol se encontró en el presente hospital, en una concentración de 0.018 μ g/L. se ha reportado ser capaz de inducir estrés oxidativo, daño al ADN y alteraciones al desarrollo embrionario en *Cyprinus carpio* y *Dendroaster excentricus* a concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1, 1, and 10 mg/L (Orozco-Hernández *et al.*, 2018; Rempel *et al.*, 2009).

Los resultados de **embrioletalidad** encontrados en este estudio demostraron que el efluente hospitalario evaluado es muy tóxico para los ovocitos de *Cyprinus carpio*, ya que una proporción de 5.64% del efluente hospitalario provocó una mortalidad del 50% de los ovocitos expuestos. Diversos estudios han demostrado la ocurrencia y efectos tóxicos de efluentes hospitalarios sobre algunos organismos acuáticos como bacterias, algas, crustáceos y peces, por la presencia de diversos contaminantes presentes en esta descarga (Jolibois y Guerbet, 2006; Zgorska *et al.*, 2011; Magdaleno *et al.*, 2012) Trabajos anteriores con efluentes hospitalarios en México sobre especies juveniles de *Cyprinus carpio*, por Neri cruz *et al.*, 2015 y Olvera- Néstor *et al.*, 2016 reportaron una CL50 de 5.5 % y 5.49 %, respectivamente. En otras especies se ha reportado valores como desde CE₅₀18.77% en

Pseudokirchneriella subcapitata, hasta CE₅₀ 59.77% en *Artemia salina* (Zgorska *et al.*, 2011).

El efluente hospitalario en estudio demostró **inducir alteraciones al desarrollo embrionario** y efectos teratogénicos en ovocitos de *Cyprinus carpio* expuestos a las diferentes proporciones del efluente hospitalario, con una EC₅₀=3.852%.

Las malformaciones y afectaciones al desarrollo embrionario son mayores en los últimos estadios del desarrollo (72 y 96 hpf) y en las proporciones más altas de E.H. La diferencia en el desarrollo embrión de los organismos expuestos con respecto a los testigos, se observa a partir de las 48 hpf, esto por la aparición de nuevas estructuras o características fisiológicas en el embrión, las cuales pueden verse afectadas por los diversos contaminantes del efluente hospitalario.

Son pocos los estudios que han estudiado el potencial teratogénico y embriotóxico del efluente hospitalario, como Pérez-Álvarez *et al.*, 2018, donde demostraron la inducción de embriototoxicidad en *Xenopus laevis* and *Lithobates cataesbeianus* mediante el ensayo FETAX; reportando afectaciones como malformación craneal, cola doblada, microcefalia, edema cardíaco, edema facial, malformaciones oculares y severas. Así como la inducción de estrés oxidativo.

Dentro de las malformaciones observadas en los ovocitos de *Cyprinus carpio* después de la exposición a EH se encontró con mayor frecuencia: deformación del saco vitelino, escoliosis, modificación de la estructura de la notocorda, malformación de la cola, deformación de las aletas e hiperplasia de la boca. Y en menor frecuencia malformaciones esqueléticas, y edema pericárdico. El **saco vitelino** está presente en la mayoría del desarrollo embrionario, es capaz de biotransformar productos (Honkanen *et al*; 2008). Contiene enzimas asociadas a su catabolismo, la biotransformación de compuestos y puede alterar el efecto de la sustancia teratogénica. Se observa un aumento gradual de las enzimas antioxidantes durante la embriogénesis (Barile, 2007). Lo que puede aumentar la cantidad de radicales libres y por ende generar estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos sobre los efectos embriotóxicos y teratogénicos presentados en los ovocitos de *Cyprinus carpio*, pueden ser explicados por los mecanismos de acción de los compuestos presentes en el efluente hospitalario.

Los metales han sido asociados con estrés oxidativo en organismos acuáticos (Gómez Oliván *et al.*; 2017), ya que los radicales libres que se forman son capaces de inducir lipoperoxidación, carbonilación de proteínas y daño al ADN (Lushchak, 2011). Los metales pueden afectar una gran variedad de procesos fisiológicos, bioquímicos y metabólicos en el desarrollo de ovocitos de peces como *Cyprinus carpio*, derivando en retraso en el desarrollo, anomalías morfológicas y funcionales o la muerte de los individuos más sensibles (Jeziarska *et al.*, 2009).

Se ha reportado que los metales (Cd, As, Pb) alteran el proceso osmótico de los ovocitos y la actividad enzimática; también inducen retraso en el crecimiento, malformaciones de la columna espinal y alteraciones del tamaño del saco vitelino (Jeziarska *et al.*, 2009; García *et al.*, 2006). Estos metales son miméticos al Ca^{+2} y pueden atravesar la membrana, desde la neurulación. Además, pueden ocupar los sitios del calcio en numerosas proteínas. (Jeziarska *et al.*, 2009). Pueden llegar a afectar la actividad enzimática de enzimas como citrato sintasa, succinato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y la Ca^{2+} -ATPasa, entre otras (Shaw y Handy, 2011; Baldisserotto *et al.*, 2004).

Se ha observado, que metales como Pb, Cd, Cu y Zn son capaces de generar retrasos en la organogénesis, retardo en el proceso de pigmentación del ojo y del cuerpo. También se ha observado alteraciones en el latido del corazón y retraso en la eclosión en especies como *Cyprinus carpio* y *Melanotaenia fluviatilis* (Witeska *et al.*, 2014; Williams y Holdway, 2000). Los metales son capaces de generar diversos efectos teratogénicos como deformación de la notocorda, escoliosis, edema de la aleta dorsal, edema en los ojos, boca, cabeza y malformación de ojos, hipopigmentación, deformaciones en el saco vitelino, en especies como *Pimephales promelas*, *Clarias gariepinus*, *Danio rerio* y *Cyprinus carpio* (Cheng *et al.*, 2000; Hallare *et al.*, 2005; Osman *et al.*, 2007).

En caso de los fármacos, los antiinflamatorios no esteroideos como el IBP a concentraciones de 10- 100 $\mu\text{g/L}$ han demostrado inducir algunas alteraciones como edema pericárdico, disminución de la frecuencia cardiaca, malformaciones y pérdida de las aletas pectorales en embriones de *Danio rerio* (David y Pancharatna, 2009). En *X. laevis* y *L. catesbeianus* a concentraciones de generó malformaciones en la cola y la notocorda, edema múltiple, retraso en el crecimiento, hipopigmentación e inhibición del crecimiento (Cardoso –Vera *et al.*, 2017). Se ha demostrado que hay un incremento en el tiempo de eclosión por exposición a DCF e IBP a diferentes concentraciones en pez zebra y en japonés Medaka (David y Pancharatna, 2009; Lee *et al.*, 2011). Estos efectos se atribuyen a los mecanismos de acción del IBP que es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1), ya que las prostangladinas obtenidas de este enzima son necesarias para el proceso de segmentación en los huevos, neurotransmisión de señales y regulación del sistema circulatorio (David y Pancharatna, 2009; Cardoso –Vera *et al.*, 2017).

Algunos estudios han reportado que el fenómeno de estrés oxidativo genera daños a los ovocitos, así como alteraciones mitocondriales, depleción de ATP, daño al ADN, apoptosis y retrasos en el desarrollo embrionario en embriones de mamíferos y humanos (Aitken y Krausz, 2001). De forma similar a los hallazgos encontrados en mamíferos se ha demostrado el rol de estrés oxidativo en la generación de alteraciones en embriones y larvas de peces como *Pleuragramma antarcticum*, *Oncorhynchus mykiss*, y *Macrobrachium rosenbergii* (Dandapat *et al.*, 2003; Dietrich *et al.*, 2005; Regoli *et al.*, 2005). De manera general, se ha asociado al estrés oxidativo es un mecanismo que puede generar alteraciones.

Los Disruptores Endocrinos como 17 β estradiol generaron edema y microcefalia en *Xenopus laevis*, lo que se correlaciono con inhibición de la expresión génica (Sone *et al.*, 2004). Estos compuestos pueden interactuar con receptores estrogenitos y modificar la síntesis, liberación, transporte, unión, acción y eliminación de hormonas estrogénicas, afectando el comportamiento y desarrollo de los organismos expuestos a estas sustancias (Dumitrescu *et al.*, 2009). Los receptores estrogenitos se han asociado con la regulación transicional de varias proteínas que participan en la proliferación y diferenciación celular.

El hipoclorito de sodio ha generado afectación sobre la longitud de la larva del erizo de mar, generando longitud esquelética más cortas (Rock *et al.*, 2011). En *Daphnia magna* generó afectaciones esqueléticas y a los tubos de Malpighian (Ton *et al.*, 2012). Este compuesto también podría estar asociado a la reducción de longitud en los fetos humanos, después de consumo por parte de la madre de agua desinfectada con NaClO. Ya que se ha visto que la unión de compuestos clorado con hemoglobina, origina metahemoglobina y esto podría generar hipoxia, un factor de teratogénesis (Kanitz *et al.*, 1996).

Se ha reportado el efecto tóxico de diversos contaminantes presentes en el efluente hospitalario sobre organismos acuáticos por separado. En este tipo de efluentes, los contaminantes se encuentran en **mezclas complejas**, donde pueden interactuar entre sí alterando su toxicidad. Prestando principalmente un enfoque de aditividad cuando los mecanismos de acción de los productos químicos son similares, aunque hay evidencia de interacciones casi aditivas, incluso con productos químicos que tienen diferentes mecanismos de acción (Emmanuel *et al.*; 2005; Li y Lin, 2015). Por ejemplo, los metales pueden presentar interacción sinérgica entre ellos, potenciando sus efectos tóxicos (Kosmehl *et al.*, 2012). De igual manera los fármacos pueden interactuar entre sí y con los metales generando efectos aun a concentraciones traza ($\mu\text{g/L}$ - ng/L) (Quinn *et al.*, 2009).

Este tipo de mezclas complejas puede contener diversos metabolitos y los subproductos de transformación generados por los compuestos, principalmente los derivados de productos farmacéuticos. Los cuales pueden generarse después de someter las descargas a un proceso de remoción o al entrar en contacto con el ambiente y con los organismos sufriendo procesos de biotransformación (Lin y Lin, 2015).

PERSPECTIVAS

Se **recomienda** seguir realizando estudios de este tipo de descargar, en diferentes temporadas de muestreo, con diferentes organismos y a largo plazo, ya que se cuenta con poca información al respecto.

Así como monitorear la eficiencia del tratamiento que se le da al efluente hospitalario, considerando las actividades y los microcontaminantes que pudieran estar presentes en el efluente. Y modificar las normas mexicanas, incluyendo producto químico y farmacéuticos, por lo menos aquellos incluido en la lista de prioridades europeas (Carraro *et al.*, 2016).

9. Conclusión

Los parámetros físico químicos del efluente hospitalario estudiado se encuentra dentro de los valores reglamentarios permitidos por las normas mexicanas, pero el efluente hospitalario es una mezcla compleja que puede llegar a generar efectos teratogénicos, embriotóxicos y letales en especie acuáticas como *Cyprinus carpio*.

En este estudio se obtuvo un valor de $LC_{50} = 5.654\%$, de $EC_{50}=3.852\%$ y un índice teratogénico de 1.467, después de exponer ovocitos a diferentes concentraciones de esta descarga, por lo que podemos decir que el efluente hospitalario es teratogénico para ovocitos de *Cyprinus carpio*. Dentro de las principales malformaciones encontradas en los ovocitos se encuentran: deformación del saco vitelino, escoliosis, notorda modificada, malformación de la cola, hiperplasia de la boca y retraso de la eclosión.

Los principales microcontaminantes encontrados en el efluente hospitalario fueron metales (As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn) en concentraciones entre 0.017 y 0.478 mg/L, 11 productos farmacéuticos, entre los que se encontraron AINE's, antibióticos, antidiabéticos β -bloqueadores y hormonales, en concentraciones de 0.018 $\mu\text{g/L}$ a 4.01 $\mu\text{g/L}$ y productos de limpieza como el hipoclorito de Sodio (1.3 mg/L). Algunos de los cuales no se encuentran considerados en las normas mexicanas y han demostrado tener efectos teratogénicos y letales sobre organismos acuáticos a esas concentraciones. Los podrían ser la causa de los efectos teratogénicos encontrados en el presente estudio, así como la mezcla de estos productos, sus metabolitos y productos de degradación.

Es necesario seguir haciendo estudios y seguimiento a este tipo de descargas, con el fin de proponer un manejo adecuado de este tipo de mezclas complejas, como serían métodos nuevos de tratamiento de aguas residuales o la incorporación de compuestos a las normas mexicanas, como es el caso de los productos farmacéuticos y sus metabolitos.

10. Bibliografía

- o Aguirre-Martínez G.V., Owuor M.A., Garrido-Perez C., Salamanca M.J., Del Valls T.A., M.L. Martin-Diaz M.L. (2015). Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere* 120: 75–85.
- o Aitken R.J., Krausz C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 122: 497–506.
- o Al Aukidy M., Al Chalabi S. and Verlicchi P. (2017). Hospital Wastewaters - Characteristics, Management, Treatment and Environmental Risks, *Hdb Env Chem*. Springer International Publishing. 60: 171–188.
- o Al-ajlouni, K., Shakhathreh, S., Ibraheem, N. A. y Jawarneh, M. (2009). Evaluation of Wastewater Discharge from Hospitals in Amman -JORDAN. *International Journal of Basic & Applied Sciences*. 13(04): 44–50.
- o Altamirano-Lozano M., Toledo-Herrera D., Rodríguez-Canto A. y Figueroa-Lucero G. (2005). *Chirostoma humboldtianum* como modelo in vitro para el estudio de embriotoxicidad de metales pesados. I cloruro de cadmio. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 21 (1):71-77.
- o Álvarez G.C. (2011). Efectos teratogénicos del nitrato de plomo en el desarrollo embrionario del pez cebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822) a cinco dosis subletales. Tesis para obtener el grado de licenciada en Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- o Antón D. y Díaz D.C. (2000). *Sequía en un mundo de agua*. (Uruguay-México: Piriguazú y Centro Interamericano de Recursos del Agua (CIRA) y Universidad Autónoma del Estado de México. pp: 27, 171-174).
- o Apha, Awwa, Wpcf. (1992). *Métodos Normalizados para el Análisis del Agua y Aguas Residuales*. Díaz de Santos. Pp 1816.

- o Bagatini, M. D., Vasconcelos, T. G., Laughinghouse IV, H. D., Martins, A. F. y Tedesco, S. B. (2009). Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* L. test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 82(5): 590–592.
- o Bain, N. T., Madan, P., & Betts, D. H. (2011). The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. *Reproduction, Fertility and Development*. 23(4): 561–575.
- o Bakshi A., Panigrahi A.K. (2018). A comprehensive review on chromium induced alterations in fresh water fishes. *Toxicology*. 5:440–447.
- o Baldisserotto B., Kamunde C., Matsuo A., Wood C.M. (2004). A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. 7:57–73.
- o Barcelò, L.D., y López, M. J. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico-Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.
- o Barile F. A. (2013). Principles of Toxicology Testing. Principles of Toxicology Testing.
- o Berto, J., Canan G. Rothenbach, Barreiros B.M.A. Corre A.X.R., Peluso-Silva S., Radetski C.M. (2009). Physico-chemical, microbiological and ecotoxicological evaluation of aseptic tank/Fenton reaction combination for the treatment of hospital wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72: 1076–1081.
- o Boillot, C., Bazin, C., Tissot-Guerraz, F., Droguet, J., Perraud, M., Cetre, J. C., Perrodin, Y. (2008). Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Science of the Total Environment*. 403(1–3): 113–129.
- o Buschini A., Martino A., Gustavino B., Monfrinotti M., Poli P., Rossi C., Rizzoni M. (2004). Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus*

carpio specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 557(2): 119–129.

o Camargo R.O., Ramirez C. J.L: y Olvera A.M. (1999). Radicales libres y desarrollo embrionario.

o Carabias J y Landa R. (2005). Agua, medio ambiente y sociedad. Hacia la gestión integral de los recursos hídricos en México. Universidad Nacional Autónoma de México. El Colegio de México. Fundación Gonzalo Rio Arronte. México. Pag 15.

o Cardoso-Vera J. D., Islas-Flores H., SanJuan-Reyes N., Montero-Castro E. I., Galar-Martínez M., García-Medina S., Gómez-Oliván L. M. (2017). Comparative study of diclofenac-induced embryotoxicity and teratogenesis in *Xenopus laevis* and *Lithobates catesbeianus*, using the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX). *Science of the Total Environment*. 574: 467–475.

o Carraro E., Bonetta S. y Bonetta S. (2017). Hospital Wastewaters - Characteristics, Management, Treatment and Environmental Risks, Springer International Publishing.

o Carraro, E., Bonetta, S., Bertino, C., Lorenzi, E., Bonetta, S., y Gilli, G. (2016). Hospital effluents management: Chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. *Journal of Environmental Management*. 168: 185–199.

o Cheng S. H., Wai A. W. K., So C. H., y Wu R. S. S. (2000). Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19(12): 3024–3031.

o CONAGUA, (s.f.). Comisión Nacional del Agua. Recuperado de: http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Contenido/Documentos/Capitulo_3.pdf. Visitado 22-05-17.

o Corrales M.L.C. y Muñon A.M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias Biomédicas*. 18 (10), 135 – 250.

o Dandapat J., Chainy G.B.N., Rao K.J. (2003). Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Toxicology Pharmacology*. 135C: 221–233.

- o David A. y Pancharatna K. (2009). Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 27: 390–395.
- o Dennery, P.A. (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*. 81: 155–162.
- o Deutschmann, B., Kolarevic, S., Brack, W., Kaisarevic, S., Kostic, J., Kracun-Kolarevic, M., Liska, I., Paunovic, M., Seiler, T.-B., Shao, Y., Sipos, S., Slobodnik, J., Teodorovic, I., Vukovic-Gacic, B., Hollert, H. (2016). Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*) assessed using the comet and micronucleus assay. *Science of The Total Environment*. 573: 1441–1449.
- o Devlin E. W. y Mottet N. K. (1992). Embryotoxic action of methyl mercury on coho salmon embryos. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 49(3): 449–454.
- o Dietrich G.J., Szpyrka A., Wojtczak M., Dobosz S., Goryczko K., Żakowski Ł., Ciereszko A. (2005). Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*. 64:1809–1822.
- o Diwan V., Tamhankar A.J., Khandal K.R., Sen S., Aggarwal M., Marothi Y., Iyer R.V., Sundblad-Tonderski K. y Stålsby- Lundborg C. (2010). Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *BMC Public Health*, 10(414), 414.
- o Dumitrescu G., Petculescu-ciochina L. y Voia S. (2009). Evaluation of Ethinylestradiol (E₂) Effect on Embryo Development in Common Carp Evaluarea Efectului Etinilestradiolului (E₂) Asupra Dezvoltării Rii Embrionare La Crapul, 42(2): 33–39.
- o Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J. M., y Vermande, P. (2005). Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: A proposed framework for raw

effluents discharging into urban sewer network. *Journal of Hazardous Materials*. 117(1): 1–11.

o Escher, B. I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., & McArdell, C. S. (2011). Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Research*, 45(1), 75–92.

o FAO, 2019. Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es

o Fernández C.A. 2012. El agua: un recurso esencial. *Química Viva*. (3). pp. 147-170.

o Fernández, C., Beltrán, E.M., Tarazona, J.V., 2014. Pharmaceuticals effects in the environment. *Encyclopedia of Toxicology*. 844–848

o García, F. P., Araceli, O., Ramírez, B., Scoot, W., & Gaytán, J. C. (2006). Acumulación, toxicidad y teratogénesis provocada por presencia de arsénico en aguas en el pez cebra (*Danio rerio*) Introducción. *AquaTIC*. 24: 72–85.

o García-Medina, S., Angélica Núñez-Betancourt, J., Lucero García-Medina, A., Galar-Martínez, M., Neri-Cruz, N., Islas-Flores, H. y Manuel Gómez-Oliván, L., (2013). The relationship of cytotoxic and genotoxic damage with blood aluminum levels and oxidative stress induced by this metal in common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 96: 191–197

o Gavrilescu et al., 2014;

o Gelder V., M. M. H. J., van Rooij, I. A. L. M., Miller, R. K., Zielhuis, G. A., de Jong-van den Berg, L. T. W., & Roeleveld, N. (2010). Teratogenic mechanisms of medical drugs. *Human Reproduction Update*. 16(4):378–394.

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

o Gómez-Oliván L.M., Mendoza-Zenil Y.P., SanJuan-Reyes N., Galar-Martínez M., Ramírez- Durán N., Rodríguez Martín-Doimeadios R. del C., Rodríguez-Fariñas N., Islas-Flores H., Elizalde-Velázquez A., García-Medina S., Pérez-Pastén Borja R. (2017). Geno-

and cytotoxicity induced on *Cyprinus carpio* by aluminum, iron, mercury and mixture thereof. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 135, 98–105

- o González -González E.D., Gómez- Oliván L.M., Galar- Martínez M., Vieyra-Reyes P., Islas-Flores H., García-Medina S., Jiménez-Vargas J.M., Razo-Estrada C., Pérez- Pasten R. (2014). Metals and Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceuticals Drugs Present in Water from Madí'n Reservoir (Mexico) Induce Oxidative Stress in Gill, Blood, and Muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*
- o Gopal, K., Tripathy, S. S., Bersillon, J. L. y Dubey, S. P. (2007). Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water. *Journal of Hazardous Materials.* 140(1–2):1–6.
- o Gouge, R. C., Marshburn, P., Gordon, B. E., Nunley, W. y Huet-Hudson, Y. M. (1998). Nitric Oxide as a Regulator of Embryonic Development. *Biology of Reproduction*, 58(4), 875–879.
- o Guérin, P., El Mouatassim, S., & Ménézo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7(2), 175–189.
- o Gutiérrez-gómez A.A., Juan-reyes N.S., Galar-Martínez M., Dublán-García O., Islas-Flores H., Pérez-Alvárez I. y Gómez-Oliván L.M. (2016). 17 β -estradiol induced oxidative stress in gill, brain, liver, kidney and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Electronic Journal of Biology.* 12:53–63.
- o Hallare A.V., Schirling M., Luckenbach T., Köhler H.-R., Tribskorn R., (2005). Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology.* 30: 7–17.
- o Hamilton, M. A., Russo, R. C. y Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11(7), 714–719.

- o Hansen, J. M., & Harris, C. (2013). Redox control of teratogenesis. *Reproductive Toxicology*. 35(1):165–179.
- o Heath A.G. (1995). *Water pollution and fish physiology*. 2ª. Edición. Lewis Publishers. U.S. pág. 1.
- o Helwig K., Hunter C., Maclachlan J., Mcnaughtan M., Roberts J., Cornelissen A., Nafø I. (2013). Maternal Dioxin and Fetal Neuroendocrine Dysfunction. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 3(4).
- o Hermesen S. A. B., van den Brandhof E.-J., van der Ven L. T. M. y Piersma A. H. (2011). Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicology in Vitro*. 25(3): 745–753.
- o Honkanena J.O., Wiegand C. and Kukkonena J.V.K. 2008. Humic substances modify accumulation but not biotransformation of pyrene in salmon yolk-sac fry. *Aquatic Toxicology*. 86 (2): 239-248.
- o Huang, D.J., Zhang, Y.M., Song, G., Long, J., Liu, J.H., Ji, W.H. (2007). Contaminants-Induced Oxidative Damage on the Carp *Cyprinus carpio* Collected from the Upper Yellow River, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 128: 483–488.
- o Islas-Flores H., Gómez-Olivan L.M., Galar-Martínez M., Colín-Cruz A., Neri-Cruz N. y García-Medina S. (2013). Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 92, 32-38.
- o Ismail A. y Yusof S. (2011). Effect of mercury and cadmium on early life stages of Java medaka (*Oryzias javanicus*): A potential tropical test fish. *Marine Pollution Bulletin*. 63(5–12): 347–349.
- o Jezierska B., Ługowska K. y Witeska M. (2009). The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4): 625–640.
- o Jolibois, B., & Guerbet, M. (2006). Hospital wastewater genotoxicity. *Annals of Occupational Hygiene*. 50(2): 189–196.

- o Kanitz S., Franco Y., Patrone V., Caltabellotta M., Raffo E., Riggi C., Ravera G. (1996). Association between drinking water disinfection and somatic parameters at birth. *Environmental Health Perspectives*. 104(5): 516–520.
- o Kimmel C.B., Ballars W.W., Kimmel S.R., Ullmann B. y Schilling T.F. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203, 253-310.
- o Kosmehl T., Otte J. C., Yang L., Legradi J., Bluhm K., Zinsmeister C., Hollert H. (2012). A combined DNA-microarray and mechanism-specific toxicity approach with zebrafish embryos to investigate the pollution of river sediments. *Reproductive Toxicology*. 33(2): 245–253.
- o Laffite A., Kilunga P., Kayembe J., Devarajan N., Mulaji C.M., Giuliani G. Slaveykova V.I and Poté J. (2016). Hospital Effluents Are One of Several Sources of Metal, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Markers Disseminated in Sub-Saharan Urban Rivers. *Frontiers in Microbiology*. 7, 1128-1142.
- o Langford K. H. y Thomas K. V. (2009). Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environment International*. 35(5): 766-770.
- o László H.O., Tamás G. y Seagrave C. (2002). *Carp and Pond Fish Culture* (2a. ed., Pp 170). London: Fishing News Books and Blackwell Science.
- o Le Corre, K.S., Ort, C., Kateley, D., Allen, B., Escher, B.I., Keller, J. (2012). Consumptionbased approach for assessing the contribution of hospitals towards the load of pharmaceutical residues in municipal wastewater. *Environ. Int.* 45: 99-111.
- o Lee J., Ji K., Lim Kho Y., Kim P., Choi K. (2011). Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74:1216–1225.
- o Li, S. y Lin, A. Y. (2015). Chemosphere Increased acute toxicity to fish caused by pharmaceuticals in hospital effluents in a pharmaceutical mixture and after solar irradiation. *CHEMOSPHERE*. 139: 190–196.

- o Leonart Isaias., Alejandra, G. G. S., & Annelisse, B. I. (2015). Teratogénesis; consideraciones y actualización. *Revista Electronica de Veterinaria*, 16(9), 149–312.
- o López-Serna, R., Petrović, M., 2012. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Science of the Total Environment*. 440: 280–289.
- o Lushchak V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30.
- o Magdaleno A., Juárez A.B., Dragani V., Saenz M. E., Paz M. y Moretton J. (2014). Ecotoxicological and Genotoxic Evaluation of Buenos Aires City (Argentina) Hospital Wastewater. *Journal of Toxicology*. Hindawi Publishing Corporation. 2014: 1-10.
- o Magdaleno, A., Juárez, Á. B., Paz, M., Tornello, C., Núñez, L., Moretton, & Juan. (2012). Evaluación ecotóxica y genotóxica de aguas residuales hospitalarias. *Acta Toxicológica Argentina*. 20(1): 14–24.
- o Mañon W.R., Garrido G. y Nuñez S.A.J. (2016). Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*. 4(2), 62-83.
- o Mojer, A. M. (2015). Phenotypic study for embryonic and larval development of common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). *Mesopot. J. Mar. Sci*, 30(2), 98–111
- o Moreno-Ortiz V.C., Martínez-Núñez J.M., Kravzov-Jinich J., Pérez-Hernández L.A., Moreno-Bonett C., Altagracia-Martínez M. (2013). Los medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 44(4): 17-29.
- o Neri-Cruz N., Gómez-Oliván L.M., Galar- Martínez M., Romero-Figueroa M.S., Islas-Flores H., García-Medina S., Jiménez-Vargas J.M., SanJuan-Reyes N. (2015). Oxidative stress in *Cyprinus carpio* induced by hospital wastewater in México. *Ecotoxicology*. 24:181–193.
- o Nuñez L. (2010). Efluentes hospitalarios: características y riesgos sanitarios. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 10: 575-583.

- o OECD, 1998. Test No. 212 Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages test.
- o OECD, 2013. Test No. 236: fish embryo acute toxicity (FET) test.
- o Oliveira T, Audiky M y Verlichi, (2017). Occurrence of Common Pollutants and Pharmaceuticals in Hospital Effluents. Hospital Wastewaters. Characteristics, Management, Treatment and Environmental Risks. Springer ed.U.S.A. pp 17-32.
- o Olvera-Néstor C.G., Morales-Ávila E., Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., García-Medina S., Neri-Cruz S. (2016). Biomarkers of Cytotoxic, Genotoxic and Apoptotic Effect in *Cyprinus carpio* Exposed to Complex Mixture of Contaminants from Hospital Effluents. *Bull Environ Contam Toxicol*. 96:326–332.
- o OMS. (Organización Mundial de la Salud). 2006. Guías para la calidad del agua potable. 3ª edición. Vol 1. Organización Mundial de la Salud. Pp 408.
- o Orozco-Hernández, L., Gutiérrez-Gómez, A.A., SanJuan-Reyes, N., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Natividad, R., Gómez-Oliván, L.M. (2018). 17β-Estradiol induces cyto-genotoxicity on blood cells of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 191, 118–127.
- o Park J.M., Jun M. S., Yim H.S. y and Ho Han K. (2017). Egg Development and Larvae and Juveniles Morphology of Carp, *Cyprinus carpio* in Korean. *Development & Reproduction*. 21 (3): 287-295.
- o Paz, M., Magdaleno, A., Tornello, C., Balbis, N., & Moreton, J. (2008). Genotoxicidad y determinación de compuestos tóxicos en un residuo líquido hospitalario de Buenos Aires, Argentina. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. 24(2): 79–87.
- o Pérez-Alvarez, I., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Barceló, D., López De Alda, M., Pérez Solsona, S., Sánchez-Aceves, L., SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., 2018. Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, Mexico, and evaluation of their toxic impact. *Environmental Pollution* 240, 330–341.

- o Pignata C., Fea E., Rovere R., Degan R., Lorenzi E., de Ceglia M., Gilli G. (2012). Chlorination in a wastewater treatment plant: acute toxicity effects of the effluent and of the recipient water body. *Environmental Monitoring and Assessment*. 184(4): 2091–2103.
- o Poma P.A. (2008). Intoxicación por plomo en humanos. *Anales de la Facultad de Medicina*. 69 (2): 120-126.
- o Postma J. F., De Valk S., Dubbeldam M., Maas J. L., Tonkes M., Schipper C. A. y Kater B. J. (2002). Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 53(2): 226–237.
- o Quinn B., Gagnè F. y Blaise C. 2009. Evaluación de los efectos agudos, crónicos y teratogénicos de una mezcla de once productos farmacéuticos en el cnidario. *Hydra attenuata*. *Science of The Total Environment*. 407 (3): 1072-1079.
- o Radjenovic´a J., Petrovic M., Barcelò D. (2006). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*. 43: 8 3 1 – 8 4 1
- o Regoli F., Nigro M., Benedetti M., Fattorini D., Gorbi S. (2005). Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. *Aquatic Toxicology*. 75: 43–52.
- o Rempel M.A., Hester B., DeHaro H., Hong H., Wang Y., Schlenk D. (2009). Effects of 17 β -estradiol, and its metabolite, 4-hydroxyestradiol on fertilization, embryo development and oxidative DNA damage in sand dollar (*Dendraster excentricus*) sperm. *Science of the Total Environment*. 407.
- o Rock M. O., Davis-Berg E. C. y Wilson B. A. (2011). Development of the Sea Urchin *Arbacia Punctulata* in the Presence of the Environmental Toxin Sodium Hypochlorite. *Journal of Environmental Protection*. 02(08): 1127–1133.
- o Romero R. J. A. 1999. Calidad del agua (2ª). ALFAOMEGA. México. 63-130.

- o Sahar, E., David, I., Gelman, Y., Chikurel, H., Aharoni, A., Messalem, R. y Brenner, A. (2011). The use of RO to remove emerging micropollutants following CAS/UF or MBR treatment of municipal wastewater. *Desalination*. 273(1): 142–147.
- o San Juan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Islas-Flores, H., Castro-Pastrana, L.I. (2017). *Control of Environmental Pollution Caused by Pharmaceuticals*. Springer: 255–264.
- o SARGARPA. 2017. *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca*. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México. Pag 24.
- o Sauer, H., Rahimi, G., Hescheler, J., & Wartenberg, M. (2000). Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Letters*. 476(3): 218–223.
- o Sauer, H., Wartenberg, M., & Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 11(4), 173–186.
- o Saxèn L. (1973). Mechanisms of teratogenesis. *American Journal of Anatomy*, 136(2), 129–131.
- o Sharma P. Mathur N., Singh A and Bhatnagar P. (2013). REVIEW on genotoxicity of hospital wastewaters. *Journal of Chemistry Science*. 11(1): 237-249.
- o Shaw B.J., Handy R.D. (2011). Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. *Environ. Int.* 37:1083–109.
- o Snyder, S. A., Adham, S., Redding, A. M., Cannon, F. S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J. Yoon, Y. (2007). Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination*. 202(1–3): 156–181.
- o Sogorb, M. A., Pamies, D., de Lapuente, J., Estevan, C., Estévez, J., & Vilanova, E. (2014). An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. *Toxicology Letters*, 230(2), 356–367.

- o Sone K., Hinago M., Kitayama A., Morokuma J., Ueno N., Watanabe H. e Iguchi T. (2004). Effects of 17 β -estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *General and Comparative Endocrinology*. 138(3); 228–236.
- o Sun L., Xin L., Peng Z., Jin R., Jin Y., Qian H. y Fu Z. (2014). Toxicity and enantiospecific differences of two β -blockers, propranolol and metoprolol, in the embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 29(12), 1367–1378.
- o Ton S. S., Chang S. H., Hsu L. Y., Wang M. H. y Wang K. S. (2012). Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of disinfectants by *Daphnia magna* embryo assay. *Environmental Pollution*. 168: 54–61.
- o Vasconcelos, T. G., Kümmerer, K., Henriques, D. M., & Martins, A. F. (2009). Ciprofloxacin in hospital effluent: Degradation by ozone and photoprocesses. *Journal of Hazardous Materials*. 169(1–3): 1154–1158.
- o Velásquez V.E. y Vega C.M.E. (2004). Los peces como indicadores del estado de salud de los ecosistemas acuáticos. *Conabio. Biodiversitas*. 57:12-15.
- o Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., & Barcelo, D. (2010). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*. 389(3–4): 416–428.
- o Villegas- Navarro A., Rodriguez Santiago M. Ruiz Perez F, Rodríguez Torres R., Dieck Abularach T. y Reyes J.L. 1997. determination of LC50 from *Daphnia magna* in treated industrial waste waters and non-treated hospital effluents. *Environment Internationa*. 23 (4): pp. 535-540.
- o Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*. 281: 25–36.
- o Wells, P. G., Kim, P. M., Laposa, R. R., Nicol, C. J., Parmana, T., & Winn, L. M. (1997). Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 396(1–2), 65–78.

- o Wells, P. G., Mccallum, G. P., Chen, C. S., Henderson, J. T., Lee, C. J. J., Perstin, J. Wong, A. W. (2009). Oxidative stress in developmental origins of disease: Teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicological Sciences*, 108(1): 4–18.
- o Williams N.D., Holdway D.A. (2000). The effects of pulse-exposed cadmium and zinc on embryo hatchability, larval development, and survival of Australian crimson spotted rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Environmental Toxicology*. 15: 165–173.
- o Witeska M., Sarnowski P., Ługowska K., Kowal E. (2014). The effects of cadmium and copper on embryonic and larval development of the *Leuciscus idus* L. *Fish Physiol. Biochem.* 40: 151–163.
- o Xia L., Zheng L. y Zhou J.L. (2017). Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on Hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 182:416–425.
- o Yang, H. W., Hwang, K. J., Kwon, H. C., Kim, H. S., Choi, K. W., & Oh, K. S. (1998). Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction*. 13(4): 998–1002.
- o Zgórska, A., Arendarczyk, A., & Grabińska-Sota, E. (2011). Toxicity assessment of hospital wastewater by the use of a biotest battery. *Archives of Environmental Protection*, 37(3), 55–61.
- o

11. Productos de la maestría



11.1 Artículo


Science of the Total Environment 690 (2019) 751–764

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

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



Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes

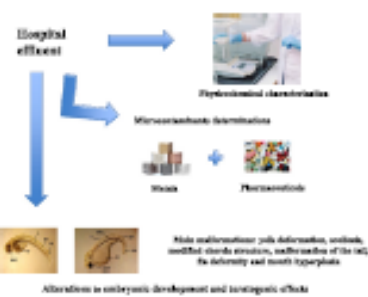
Marlenne Luján-Mondragón^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a,*}, Nely Sanjuan-Reyes^b, Hariz Islas-Flores^a, José Manuel Orozco-Hernández^a, Gerardo Heredia-García^a, Marcela Galar-Martínez^b, Octavio Dublán-García^a

^a Environmental Toxicology Laboratory, School of Chemistry, Autonomous University of the State of Mexico, Intersection of Paseo Cuicuilco and Paseo Toluca, Benito Juárez Colima neighborhood, 50120 Toluca, State of Mexico, Mexico
^b Aquatic Toxicology Laboratory, Pharmacy Department, National Institute of Biological Sciences, National Polytechnic Institute, Adolfo López Mateos Professional Unit, Weibull Morán Ave., Gustavo A. Madero District, Mexico City 03730, Mexico

HIGHLIGHTS

- Alterations embryos and teratogenic effects in *C. carpio* after exposure to hospital effluent were evaluated.
- The hospital effluent evaluated contained mainly metals and drug.
- Proportions of 3–6% of the hospital effluent generated embryolethality in *C. carpio*.
- Yolk deformation, scoliosis, modified chorda structure, tail malformation, fin deformity and mouth hyperplasia were main teratogenic effects.
- Hospital effluent under study is capable of inducing embryo toxicity and teratogenicity.

GRAPHICAL ABSTRACT



Alterations in embryonic development and teratogenic effects

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 15 November 2018
 Received in revised form 7 January 2019
 Accepted 7 January 2019
 Available online 08 January 2019

Editor: Daniela Barrois

Keywords:
 Emerging contaminants
 Hospital wastewater
 Embryotoxicity
 Teratogenicity
 Common carp

ABSTRACT

Hospital functioning generates a great quantity of contaminants, among which organic materials, heavy metals, and diverse pharmaceuticals are not worthy that can affect organisms if they are not properly removed from the effluents. The hospital effluent evaluated in the present study came from IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) Clinic 221 in downtown Toluca, State of Mexico, a secondary care facility. The contaminants identified in hospitals have been associated with deleterious effects on aquatic organisms; however, it is necessary to continue with more studies in order to be able to regulate the production of said contaminants which are generally dumped in to the city sewage system. The present study had the purpose of evaluating the alterations to embryonic development and teratogenic effects on oocytes *Cyprinus carpio* after exposure to different proportions of hospital effluent. For said purpose, the physicochemical properties of the effluent were determined. Concentrations of the main inorganic anions were also determined. An embryo lethality study and the determination of the main alterations to embryonic development and teratogenic effects produced, due to exposure of *C. carpio* at different proportions of the effluent, were carried out. The results showed that the physicochemical properties were within the values permitted by Mexican regulation; however, the presence of contaminants such as NaClO,

Abbreviations: CAT, catalase; DET, Fish Embryo Acute Toxicity; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drug; OS, oxidative stress; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; WWTP, wastewater treatment plant.

* Corresponding author at: Environmental Toxicology Laboratory, School of Chemistry, Autonomous University of the State of Mexico, Intersection of Paseo Cuicuilco and Paseo Toluca, Benito Juárez Colima neighborhood, 50120 Toluca, State of Mexico, Mexico.
 E-mail address: lmgonzalez@uamex.mx (L.M. Gómez-Oliván).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.072>
 0048-9676/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

11.2. Estancia de estudios



Demetrio Raldúa,

IDAEA-CSIC
Jordi Girona 18-24
08034 Barcelona
SPAIN

Email: drp@cid.csic.es
Tel.: +34 93 4006100
Fax: +34 93 2045904

CERTIFICADO DE ESTANCIA EN EL CENTRO RECEPTOR

El abajo firmante certifica que la estudiante de **Maestría en Ciencias Químicas de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, Marlene Luja Mondragón** en formación a quien se refiere el presente documento ha permanecido en el **Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua - CSIC** desde el día 1 de septiembre de 2018 hasta el día 28 de febrero de 2019.

17 de Junio del 2019



Dr. Demetrio Raldúa Pérez
Científico titular del IDAEA