



Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Química  
Maestría Ciencias Químicas  
Área de Química Biotecnológica y Toxicológica



Tesis para obtener el grado de Maestría

Embriotoxicidad y teratogenicidad inducido por ibuprofeno  
y paracetamol sobre la carpa común *Cyprinus carpio*.

PRESENTA:

Verónica Margarita Gutiérrez Noya.

TUTOR ACADÉMICO

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

TUTORES ADJUNTOS

Dr. Octavio Dublán García

Dra. Hariz Islas Flores

Toluca, octubre 2020

<b>ÍNDICE</b>		<b>Página</b>
<b>Resumen</b>		<b>6</b>
<b>Abstracts</b>		<b>7</b>
<b>I. Introducción</b>		<b>8</b>
<b>II. Marco conceptual</b>		<b>11</b>
<b>2.1 Usos</b>		<b>11</b>
2.1.1 Ibuprofeno		<b>11</b>
2.1.2 Paracetamol		<b>11</b>
<b>2.2 Mecanismos de Acción Farmacológico</b>		<b>11</b>
2.2.1 Ibuprofeno		<b>11</b>
2.2.1.1 Quiralidad del ibuprofeno		<b>11</b>
2.2.1.2 Inversión quiral metabólica		<b>12</b>
2.2.1.3 ibuprofeno y su acción sobre las ciclooxigenasas		<b>17</b>
2.2.2 Paracetamol		<b>21</b>
2.2.2.1 Paracetamol y el sistema icosanoide		<b>21</b>
2.2.2.2 Paracetamol y el sistema endocannabinoide		<b>23</b>
2.2.2.3 Paracetamol el sistema serotoninérgico		<b>24</b>
2.2.2.4 Paracetamol y el óxido nitroso		<b>24</b>
<b>2.3 Consumo</b>		<b>25</b>
2.3.1 Ibuprofeno		<b>25</b>
2.3.2 Paracetamol		<b>25</b>
<b>2.4 Ocurrencia</b>		<b>28</b>
2.4.1 Ibuprofeno		<b>28</b>
2.4.2 Paracetamol		<b>29</b>
<b>2.5 Toxicidad</b>		<b>31</b>
2.5.1 Toxicidad de Ibuprofeno		<b>31</b>
2.5.2 Toxicidad del Paracetamol		<b>31</b>
<b>2.6 Consideraciones generales</b>		<b>39</b>
<b>2.7 Estrés oxidativo</b>		<b>39</b>
2.7.1 Estrés oxidativo y los xenobióticos		<b>39</b>
2.7.2 Estrés oxidativo y el desarrollo		<b>39</b>
2.7.3 Formación de Especies reactivas de oxígeno EROs		<b>40</b>
2.7.4 Anión superóxido y su papel en la formación de otras especies reactivas		<b>42</b>
2.7.5 La respuesta antioxidante		<b>43</b>
<b>2.8 Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo</b>		<b>45</b>
2.8.1 Determinación del contenido de hidroperóxidos		<b>45</b>
2.8.2 Determinación de LPX		<b>46</b>
2.8.3 Determinación de proteínas carboniladas		<b>46</b>
<b>2.9 Determinación de biomarcadores de efecto antioxidante</b>		<b>46</b>
2.9.1 Método para la determinación de la actividad de catalasa		<b>46</b>
2.9.2 Método para la determinación de la actividad de peróxido dismutasa		<b>47</b>
2.9.3 Método para la determinación de la actividad Glutación peroxidasa		<b>47</b>
<b>III. Justificación</b>		<b>47</b>
<b>IV. Objetivos</b>		<b>48</b>

<b>4.1 Objetivo general</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Objetivos específicos</b>	<b>48</b>
<b>V. Materiales y métodos</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Especímenes prueba y cosecha de los ovocitos</b>	<b>48</b>
<b>5.2 Sistemas de Exposición</b>	<b>49</b>
5.2.1 Prueba de embrioletalidad	<b>50</b>
5.2.2 Evaluación de la embrioletalidad	<b>51</b>
5.2.3 Evaluación de efectos teratogénicos	<b>51</b>
5.2.4 Evaluación de estrés oxidativo inducido por IBU/PCM en embriones de <i>C. Carpio</i>	<b>54</b>
5.2.5 Análisis estadístico y criterios de evaluación de la prueba	<b>54</b>
5.2.6 Consideraciones éticas	<b>55</b>
<b>VI. Resultados</b>	<b>55</b>
<b>6.1 Datos de Embrioletalidad y Teratogenicidad</b>	<b>55</b>
6.1.1 Ibuprofeno	<b>55</b>
6.1.2 Paracetamol	<b>57</b>
<b>6.2 Principales alteraciones al desarrollo</b>	<b>58</b>
6.2.1 Ibuprofeno	<b>58</b>
6.2.2 Paracetamol	<b>60</b>
<b>6.3 Puntaje del desarrollo embrionario a diferentes tiempos y concentraciones</b>	<b>61</b>
6.3.1 Ibuprofeno	<b>61</b>
6.3.2 Paracetamol	<b>65</b>
<b>6.4 Biomarcadores de estrés oxidativo</b>	<b>69</b>
<b>VII. Discusión</b>	<b>72</b>
<b>VIII. Conclusiones</b>	<b>79</b>
<b>VIII. Perspectivas</b>	<b>80</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>81</b>

<b>Índice de figuras</b>		<b>Página</b>
<b>Fig. 1</b>	Estructura de los enantiómeros del ibuprofeno	<b>12</b>
<b>Fig.2</b>	Resumen del perfil metabólico después de la administración del racemato R, S-ibuprofeno	<b>13</b>
<b>Fig.3</b>	Inversión quiral metabólica de R-ibuprofeno y reacciones de detoxificación	<b>14</b>
<b>Fig.4</b>	Metabolismo y transporte de ibuprofeno	<b>16</b>
<b>Fig.5</b>	Modelo dual de la inhibición de las ciclooxigenasas	<b>18</b>
<b>Fig.6</b>	Representación esquemática del mecanismo de acción del ibuprofeno	<b>19</b>
<b>Fig.7</b>	Mecanismo de inhibición de la ciclooxigenasa por el paracetamol	<b>22</b>
<b>Fig.8</b>	Vía de conversión del paracetamol en AM404, un inhibidor de la recaptación endocannabinoide	<b>23</b>
<b>Fig.9</b>	Estructura del paracetamol y el nitroparacetamol	<b>24</b>
<b>Fig.10</b>	Mecanismo de formación de NAPQI	<b>32</b>
<b>Fig.11</b>	Formación de aductos proteicos	<b>33</b>
<b>Fig.12</b>	Estrés oxidativo inducido por paracetamol y su influencia sobre la señalización celular	<b>35</b>
<b>Fig.13</b>	Hepatotoxicidad mediada por paracetamol en hígado graso	<b>37</b>
<b>Fig.14</b>	Mecanismo postulado para la toxicidad mitocondrial mediada por dosis altas de paracetamol mediante especies reactivas de nitrógeno (RNS)	<b>38</b>
<b>Fig.15</b>	Panorama de estrés oxidativo sobre el desarrollo	<b>40</b>
<b>Fig.16</b>	Especies reactivas de oxígeno más comunes generadas en la mitocondria	<b>41</b>
<b>Fig.17</b>	El anión superóxido en la generación de otras especies reactivas	<b>42</b>
<b>Fig.18</b>	Las proteínas Nrf y las proteínas blanco, mantienen la señalización glutatión y redox	<b>44</b>
<b>Fig.19</b>	Función del sistema Nrf2/Keap durante la respuesta al estrés oxidativo	<b>45</b>
<b>Fig.20</b>	Embriones sobrevivientes, malformados y con efectos teratogénicos expuestos a las diferentes concentraciones de IBU	<b>56</b>
<b>Fig.21</b>	Embriones sobrevivientes, malformados y con efectos teratogénicos expuestos a las diferentes concentraciones de PCM	<b>57</b>
<b>Fig.22</b>	Principales malformaciones inducidas por la exposición a concentraciones de IBU en embriones de <i>C. carpio</i>	<b>58</b>
<b>Fig.23</b>	Principales malformaciones inducidas por la exposición de embriones de <i>C. carpio</i> ante concentraciones de PCM	<b>61</b>
<b>Fig.24</b>	Curva puntuación-tiempo de exposición de IBU sobre embriones de <i>C. carpio</i>	<b>62</b>
<b>Fig.25</b>	Curva puntuación-tiempo de exposición de PCM sobre embriones de <i>C. carpio</i>	<b>66</b>

<b>Índice de tablas</b>		<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b>	Ocurrencia de IBU en diferentes tipos de efluentes y sustratos en cuerpos de agua	<b>28</b>
<b>Tabla 2</b>	Ocurrencia de PCM en diferentes tipos de efluentes y sustratos en cuerpos de agua	<b>30</b>
<b>Tabla 3</b>	Puntaje general de la morfología	<b>52</b>
<b>Tabla 4</b>	Mortalidad y malformaciones de acuerdo a concentraciones de ibuprofeno ambientalmente relevantes en embriones de <i>C. carpio</i>	<b>56</b>
<b>Tabla 5</b>	Mortalidad y malformaciones en porcentaje de acuerdo a concentraciones de PCM ambientalmente relevantes en embriones de <i>C. carpio</i>	<b>57</b>
<b>Tabla 6</b>	Malformaciones totales inducidas por IBU a concentraciones ambientalmente relevantes	<b>59</b>
<b>Tabla 7</b>	Malformaciones totales inducidas por PCM a concentraciones ambientalmente relevantes	<b>60</b>
<b>Tabla 8</b>	Efectos a la exposición de IBU sobre las características morfológicas en embriones de <i>C. carpio</i>	<b>63</b>
<b>Tabla 9</b>	Efectos a la exposición de PCM sobre las características morfológicas en embriones de <i>C. carpio</i>	<b>66</b>
<b>Tabla 10</b>	Biomarcadores de oxidación y anti-oxidación celular en embriones de <i>C. carpio</i> a las 72 y 96 hpf, expuestos a las diferentes concentraciones de IBU	<b>70</b>
<b>Tabla 11</b>	Biomarcadores de oxidación y anti-oxidación celular en embriones de <i>C. carpio</i> a las 72 y 96 hpf, expuestos a las diferentes concentraciones de PCM	<b>72</b>

<b>Índice de Gráficas</b>		<b>Página</b>
<b>Gráfica 1</b>	Cambios anuales en las ventas de ibuprofeno y paracetamol	<b>26-27</b>

## RESUMEN

Tanto el ibuprofeno como el paracetamol son considerados como antiinflamatorios no esteroideos y han sido utilizados en varias condiciones. Sin embargo, existe una cantidad de información en la que se señala al paracetamol como un fármaco con propiedades analgésicas más que antiinflamatorias a diferencia de ibuprofeno. Las prescripciones y el consumo global de estos fármacos se han reportado en varios millones de dólares y su producción anual oscila en millones de toneladas, como consecuencia de todo ello, se ha provocado que estos fármacos estén presentes en muchos cuerpos de agua debido a su descarga al ambiente a través de los efluentes municipales, hospitalarios e industriales. Hay algunos estudios acerca de la toxicidad de estos fármacos sobre organismos acuáticos, sin embargo, se hace necesario complementar los efectos reportados con otros experimentos. Como resultado de lo expuesto, el propósito de este trabajo fue, determinar si el ibuprofeno (IBU) y el paracetamol (PCM) a concentraciones ambientalmente relevantes tendrían la capacidad de inducir alteraciones al desarrollo embrionario y efectos teratogénicos en embriones de *Cyprinus carpio*. Con esta finalidad ovocitos de carpa común fueron expuestos a concentraciones comprendidas entre 1.5-11.5 en el caso de IBU y de 0.5-3.5  $\mu\text{g/L}$  para PCM. Se determinaron  $CL_{50}$  y la  $CE_{50}$  de malformaciones, se calculó el índice teratogénico (IT) y la puntuación establecida por Kimmel y Hersem modificada por Luján-Mondragón et al. (2019), fue empleada para evaluar las alteraciones al desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos. Los resultados obtenidos durante la exposición a IBU fueron los siguientes: una  $CL_{50}$  de 4.17  $\mu\text{g/L}$ , una  $CE_{50}$  de 1.39  $\mu\text{g/L}$  y un IT de 3.0, las anomalías más comunes en el desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos fueron retraso en el proceso de eclosión, hipopigmentación, edema pericárdico, deformación del saco y retraso del desarrollo. Por otro lado, en el caso del PCM, la  $CL_{50}$  fue de 1.29 y  $CE_{50}$  de malformaciones resultó ser de 2.84  $\mu\text{L}^{-1}$  y el índice teratogénico obtenido fue de 0.45; siendo las principales malformaciones al desarrollo embrionario encontradas, las siguientes: lordosis, escoliosis, malformación craneofacial, hipopigmentación, retardo del crecimiento, edema pericárdico y raquisquisis. En base a lo anteriormente expuesto se pudo demostrar que tanto IBP como PCM a concentraciones ambientalmente relevantes son capaces de inducir embriotoxicidad y teratogenicidad en especies de interés comercial como lo es *Cyprinus carpio*. Además, se encontró que PCM es embrioletal para esta misma especie. Por otro lado, los resultados de las determinaciones de los parámetros de estrés oxidativo, mostraron incrementos substanciales en sus valores durante la exposición a las diferentes concentraciones de cada uno

de los fármacos. Concluyendo, se puede decir que tanto IBU como PCM actuando como contaminantes ambientales, son peligrosos y afectan las etapas tempranas del desarrollo de *Cyprinus carpio*.

## ABSTRACTS

Either ibuprofen and paracetamol have been considered non-steroid anti-inflammatories, which can be used under different conditions. Nevertheless, a great amount of information exists describing paracetamol's properties to be more analgesic oriented instead of having the anti-inflammatory properties characteristic to the ibuprofen. These drugs' global prescription and consumption reach immense numbers and their annual production is within millions of tons; this has caused them to appear in many water bodies due to being discharged into effluents by municipal, hospital and industrial waste waters. There are some studies that show the toxic effects of these drugs on aquatic organisms; however, it is imperative to complement such reported effects with other experiments. As a result of what has just been exposed, the soul purpose of this work was to determine if ibuprofen (IBU) and paracetamol (PCM) at environmentally relevant concentrations are capable of inducing alterations and teratogenic effects on under development *Cyprinus carpio* embryos. Acknowledging this purpose common carp oocytes were exposed to IBU concentrations within 1.5-11.5  $\mu\text{g/L}$  and to PCM concentrations within 0.5-3.5  $\mu\text{g/L}$ . Malformations were determined at  $\text{CL}_{50}$  and  $\text{CE}_{50}$  concentrations, the teratogenic index (TI) was calculated and the pointing system established by Kimmel and Hersem modified by Luja-Mondragón et al. (2019), was utilized for evaluating the embryonic development alterations and teratogenic effects. The results obtained during the IBU exposure were the following: a  $\text{CL}_{50}$  of 4.17 $\mu\text{g/L}$ , a  $\text{CE}_{50}$  of 1.39 $\mu\text{g/L}$  and a TI of 3.0, the most common embryonic development abnormalities and teratogenic effects were delaying the hatching process, hypopigmentation, pericardiac edema, sac deformation and development delay. On the other side, for PCM, the  $\text{CL}_{50}$  was of 1.29 and  $\text{CE}_{50}$  malformations resulted being of 2.84 $\mu\text{g/L}$  and the obtained teratogenic index was 0.45; being the main embryonic malformations were: lordosis, scoliosis, craniofacial malformation, hypopigmentation, growth delay, pericardiac edema and rachischisis. Based on what has being previously presented it can be demonstrated that IBU and PCM at environmentally relevant concentrations are capable of inducing embryotoxicity and teratogenicity in commercial interest species such as *Cyprinus*

*carpio*. On the other hand, the results of the oxidative stress parameters showed substantial increases in their values during exposure to the different concentrations of each of the drugs. In conclusion, it can be said that both IBU and PCM, acting as environmental pollutants, are dangerous and affect the development early stages of *Cyprinus carpio*.

## I. INTRODUCCIÓN

Los ríos, lagos y aguas profundas contienen compuestos contaminantes provenientes de diversos orígenes como lo son la industria, la agricultura, desechos hospitalarios, desechos de casa-habitación y de áreas comerciales. Así, una gran variedad de sustancias es incorporada a los cuerpos de agua por la disposición de los residuos y el tratamiento de las aguas residuales. Por lo tanto, es de suponerse que la composición química de los mismos se encuentre en un espectro muy amplio de compuestos.

Las últimas décadas, la ocurrencia de micro-contaminantes en el ambiente acuático se ha convertido en un tema de preocupación a nivel mundial. Los micro-contaminantes, también designados como contaminantes emergentes, son sustancias originadas como consecuencia de las actividades antropogénicas. Este grupo comprende a los fármacos, productos de cuidado personal, hormonas esteroideas, químicos industriales y pesticidas. Los contaminantes emergentes se encuentran presentes en el agua tanto superficial como profunda en concentraciones muy bajas, del orden de unos pocos ng/L a varios µg/L. Debido a esta característica y al hecho de encontrarse asociados a otros compuestos es complicada la aplicación de procedimientos analíticos para su identificación, convirtiendo en un reto la elección de los procesos de tratamiento pre-analítico, para su correcta identificación, (Luo, et al.,2014).

Los fármacos, que provienen principalmente de la excreción de humanos y animales enfermos y que son descargados dentro de aguas residuales, así como de desechos sólidos procedentes de los hospitales y las compañías farmacéuticas, cuya presencia en el ambiente causa toxicidad a animales acuáticos o cambios irreversibles sobre la vida salvaje. Por lo que se convierten en un tema de interés ecológico cuando se investiga la calidad del agua de los efluentes procedentes de las plantas de tratamiento, y que éstas puedan causar un impacto positivo sobre ambiente al ser incorporadas en los cauces de los ríos y otros ambientes acuáticos. (Bo, et al., 2015).



Por otro lado, tomando en consideración que los estudios de los efectos tóxicos de los fármacos como IBU y PCM sobre los organismos acuáticos son escasos y que nuestro grupo de investigación cuenta con algunas investigaciones, en las que ha encontrado que IBU a concentraciones de 170  $\mu\text{g/L}$  fue capaz de inducir estrés oxidativo en un anfípodo *Hyaella azteca* (Gómez -Oliván et al., 2014b); a 18  $\mu\text{g/L}$  generó genotoxicidad y estrés oxidativo en *Daphnia magna* (Gómez - Oliván et al., 2014a) e induce tanto bioconcentración como estrés oxidativo en diferentes órganos tales como sangre, hígado, cerebro y branquias en *C. carpio* a concentraciones de 17.6mg/L (Islas -Flores et al., 2014 ). De igual manera, en otros estudios realizados en el mundo, el IBU probó ser citotóxico y genotóxico a concentraciones de 0.2, 2 y 8  $\mu\text{g/L}$  en el valvo de agua dulce *Dreissena polymorfa* (Parolini et al., 2011). Adicionalmente, el IBU a 0.1  $\mu\text{g/L}$  se ha detectado que afecta la reproducción de los peces, generando disrupción endocrina a través de la inducción de vitelogenina en los peces machos, disminuyendo las crías por pareja y más huevos por nidada en Medaka japonés *Oryzias latipes*, el cladócero de agua dulce *D. magna* y *Moina macrocopa* (Han et al., 2010). También, el IBU a la concentración de 2.5  $\mu\text{g/L}$  mostró bioacumulación y causó alteraciones de los parámetros inmunológicos, efectos genotóxicos, modulación del metabolismo lipídico y cambios en la rotación celular en *Mytilus galloprovincialis* (Mezzelani et al., 2018). La exposición a IBU decrece significativamente el nado espontáneo en un 25% conjuntamente con la reducción en la distancia de nado libre, la duración y la velocidad en la oscuridad mostrando los siguientes valores: 41, 29 y 30% en la presencia de las concentraciones de IBU de 5, 50 y 500 $\mu\text{g/L}$  respectivamente, durante la exposición de *Danio rerio* (Xia et al., 2017).

Los hallazgos identificados por nuestro grupo de investigación, los cuales han sido mencionados anteriormente y que se encuentran basados sobre el hecho de que el IBU ha demostrado ser capaz de generar estrés oxidativo (causando lipoperoxidación, incremento en el contenido de hidroperóxidos, proteínas carboniladas y alterando las enzimas antioxidantes dentro de las que se encuentran superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peróxidasa), genotoxicidad y citotoxicidad en especies como *D. magna*, *H. azteca* and *C. carpio*.

Con lo que respecta a PCM, aunque no es un compuesto altamente persistente, éste es incorporado continuamente incorporado al ambiente, excediendo su velocidad de transformación y causando efectos adversos en los organismos acuáticos. En estudios de toxicidad aguda, se ha identificado que PCM muestra diferentes valores de  $\text{LC}_{50}$ ; por ejemplo, en invertebrados como *Daphnia magna* los valores van desde 26.6 hasta 50mg/L, en la bacteria

*Vibrio fishery* es de 549.7mg/L y en el pez *Oryzias latipes* su valor es > 160 mg/L (Henschel et al., 1997; Kim et al., 2007; Li and Randak, 2009). De igual manera, los efectos sobre la línea celular BF-2 derivada de peces, mostró un valor de EC<sub>50</sub> de 19mg/L (Henschel et al., 1997).

Otros efectos crónicos inducidos por PCM a las cuatro semanas de exposición a las concentraciones de 10 y 30 µg/L, fueron los daños histológicos a las branquias, así como un incremento en la incorporación de oxígeno en este órgano, un decremento de glucógeno hepático y daño a la estructura renal asociada a alteraciones en su función en *Oncorhynchus mykiss* (Choi et al., 2018). En un estudio dirigido por Liu et al., (2019), para evaluar el estrés oxidativo originado por la exposición a PCM a una concentración de 5 µg/L usando *Daphnia magna* a través de la determinación del factor de transcripción Nrf1 (factor-1 relacionado con el factor nuclear derivado del eritroide 2) y los genes relacionados al sistema anti-estrés (GCLC [subunidad catalítica de glutamato cisteína ligasa], GST [glutación S-transferasa], GPX [Glutación peroxidasa], CAT [catalasa], TRX [tioredoxina], TRxR [Tioredoxina reductasa] y Prx1 [Peroxiredoxina 1]). Los resultados de este estudio, demostraron que la exposición a PCM altera la expresión de Nrf1, los genes relacionados con el sistema antioxidante y la disrupción de la homeostasia redox.

Como se mencionó anteriormente, en nuestras investigaciones previas, identificamos que PCM es capaz de inducir estrés oxidativo y genotoxicidad en organismos como *Hyallela azteca*, *Daphnia magna* y *Cyprinus carpio* en concentraciones de 770, 100 y 246µg/L, a las 48, 72 y 96h, respectivamente (Gómez-Oliván et al., 2014ab, 2012; Nava-Álvarez et al., 2014). Los biomarcadores de estrés oxidativo alterados en las tres especies fueron: el nivel de lipoperoxidación (LPX), el contenido de proteínas carboniladas (PCC) y las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutación peroxidasa (GPx).

De lo anterior, se puede concluir que los efectos producidos por PCM están relacionados con las especies reactivas de oxígeno (EROs) generadas durante su biotransformación. Las especies reactivas de oxígeno son capaces de generar estrés oxidativo, oxidación de las bases púricas y pirimídicas en el DNA (genotoxicidad). El fenómeno de estrés oxidativo, ha sido asociado con los efectos embriotóxicos y teratogénicos en organismos acuáticos, y que son capaces de inducir apoptosis y alterar los procesos de transcripción y diferenciación celular (Gutiérrez-Noya et al., 2020; Lujá-Mondragón et al., 2019).

En base a todo lo anteriormente expuesto, nuestro interés está centrado en identificar si el IBU y el PCM son capaces de inducir embriotoxicidad y teratogenicidad en embriones de *C. carpio*.

Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue determinar  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$  de malformaciones, el índice teratogénico, las alteraciones al desarrollo embrionario, efectos teratogénicos y estrés oxidativo inducido por IBU/PCM a concentraciones ambientalmente relevantes en ovocitos y embriones de *C. carpio*. Esta hipótesis está sustentada en varios estudios, los cuales demostraron que el estrés oxidativo tiene una relación directa con la generación de alteraciones al desarrollo embrionario y teratogenicidad en organismos acuáticos (Combelles et al., 2009; Kupsco and Schlenk, 2015; Balbi et al., 2019; Pérez-Coyotl et al., 2019).

## **II. MARCO CONCEPTUAL**

### **2.1 Usos**

Tanto el ibuprofeno como el paracetamol pertenecen a un grupo de fármacos denominado como Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), estos comparten algunas propiedades generales pues son ácidos débiles, con excepción de la nabumetona considerado como un profármaco cetónico que debe ser metabolizado para ser transformado a la forma ácida (Katzung, 2016).

#### **2.1.1 Ibuprofeno**

El ibuprofeno es un fármaco analgésico y antiinflamatorio que es usado en el tratamiento del dolor, acompañado de una inflamación significativa, tales como artritis reumatoide leve y trastornos músculo-esqueléticos (osteoartritis, lumbago, bursitis, tendinitis, dolor de hombro, esguinces, entre otros), (Motov et al, 2019). Este fármaco es también usado en el tratamiento de dolor moderado en los periodos posquirúrgicos, dolor dental, dismenorrea y dolor de cabeza, (Reed et al., 2018; Moore et al., 2019). También, se ha documentado su uso en el tratamiento de úlceras gástricas en combinación con el ácido acetil-salicílico (Bastaki et al., 2017)

#### **2.1.2 Paracetamol**

En el caso del paracetamol, también conocido como acetaminofen (N-acetil-p-aminofenol) es un fármaco con propiedades analgésicas y antipiréticas. Se encuentra medicamento de primera línea en el tratamiento de la osteoartritis, específicamente artritis de las manos, cadera, hombros, y rodillas (Anderson, 2008). También está indicado en el caso de úlceras gástricas y duodenales, gastritis y hernia hiatal, en alergias a los salicilatos y en pacientes con hemofilia o que están recibiendo anticoagulantes, porque no altera la función plaquetaria, (Acevedo-Barrios et al., 2017). Debido a que, para su no se requiere de una prescripción, es adicionado a medicamentos usados para mejorar los síntomas de la gripe y el resfriado (Li et al., 2015).

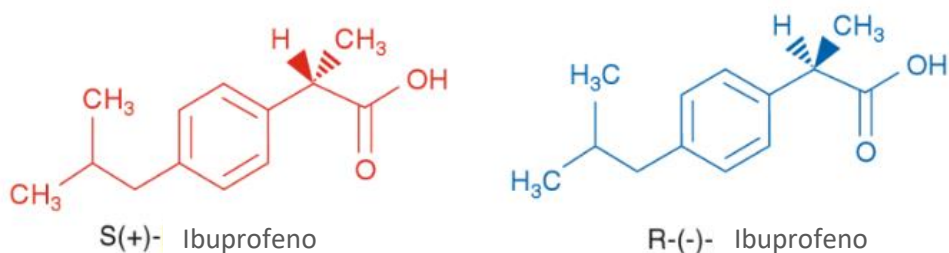
## 2.2 Mecanismos de Acción Farmacológico

### 2.2.1 Ibuprofeno

#### 2.2.1.1 Quiralidad del ibuprofeno

Las formulaciones del ibuprofeno contienen mezclas racémicas de dicho compuesto. Las características y el mecanismo involucrado en la farmacocinética del ibuprofeno, es especialmente importante para conocer las consecuencias farmacológicas y toxicológicas que puedan ayudar a predecir las interacciones potenciales de interés clínico y su influencia en los estados patológicos. La farmacocinética estereo-selectiva y el metabolismo, son características que distinguen a los antiinflamatorios no esteroideos quirales, de forma muy especial a los derivados del ácido 2-arylpropiónico caracterizados por un centro quiral adyacente al grupo carboxilo, Fig.1. Aunque la farmacocinética enantioselectiva es una característica de los AINEs cada caso debe ser tratado de forma individual, pero comparten mecanismos en lo que respecta a la unión a proteínas, su metabolismo y la inversión quiral (Hao et al., 2005)

**Figura 1. Estructura de los enantiómeros del ibuprofeno.**



(Rainsford, 2013)

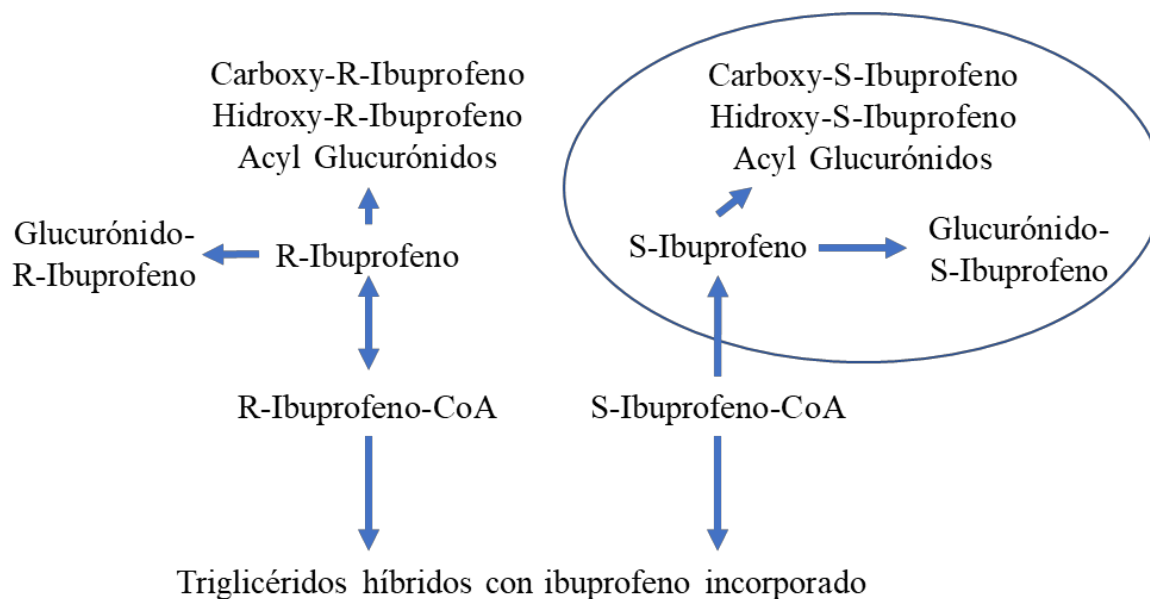
#### 2.2.1.2 Inversión quiral metabólica del ibuprofeno y detoxificación

El ibuprofeno es de la clase profeno dentro los AINEs. La inversión quiral metabólica caracteriza a los derivados del ácido arilpropiónico. Posterior a su administración, el ibuprofeno experimenta una inversión unilateral de R-ibuprofeno hasta su antípoda S-ibuprofeno. Se estima que aproximadamente entre el 50 al 65% del enantiómero R-ibuprofeno se convierte a la forma activa S-ibuprofeno.

En la Figura 2, se muestra un resumen del perfil metabólico posterior a la administración del racemato de ibuprofeno. Se puede observar que en la parte final se muestra la formación de híbridos de ibuprofeno con los triglicéridos. Esto es derivado de la participación del ibuprofeno

en la inhibición del metabolismo de los ácidos grasos. Aunque no se tiene evidencia documentada la función de este tipo de triglicéridos.

**Figura 2. Resumen del perfil metabólico después de la administración del racemato R, S-ibuprofeno**



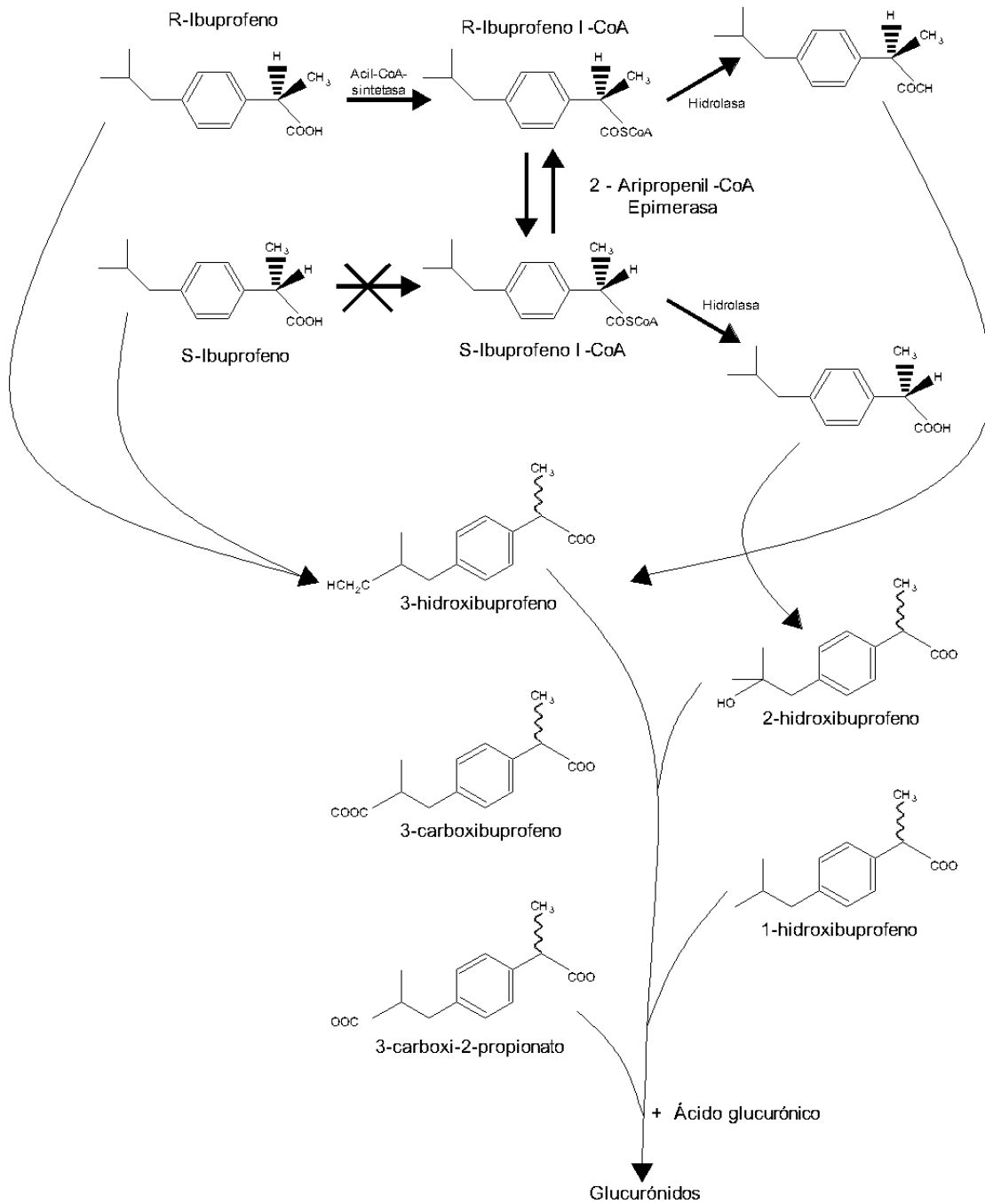
El enantiómero R-ibuprofeno tiene una gran capacidad de formar un tioéster con la coenzima A (Co-A), lo que permite una inversión en su configuración, además de involucrarse en las vías metabólicas de los lípidos (Browne et al., 1999; Evans, 2001).

A este proceso se le conoce como inversión quiral metabólica. Se ha demostrado que la reacción de R-ibuprofeno con la coenzima A es dependiente de la concentración de ésta dentro del pool y que se establece una competencia entre el enantiómero y los ácidos grasos, generando de esta manera una inhibición de la  $\beta$ -oxidación (Tan et al, 2002). Se ha reportado que esta inversión se lleva a cabo principalmente en el hígado y el intestino y los riñones (Nanau et al., 2010).

El mecanismo propuesto, sugiere que el C2 se convierte a planar por epimerización. Este carbono es reconocido por la vía de la  $\beta$ -oxidación y forma un doble enlace entre C2 y C3, con la formación de un carbanión en el C2 resultado de la disociación de protones. De esta manera, el ibuprofeno tendría la misma estructura que un ácido graso y reaccionaría con la Coenzima A (CoA), formando un éster-CoA al igual como sucede en la  $\beta$ -oxidación, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, se ha demostrado que desacoplan la fosforilación oxidativa (Hao et al., 2005).

Como consecuencia de estas propiedades se han reportado reacciones hepáticas adversas.

**Figura 3. Inversión quiral metabólica de R-Ibuprofeno y reacciones de detoxificación.**



(Rainsford, 2013)

En la Figura 3, se ilustra en la parte de arriba la conversión de R-ibuprofeno inactivo a su forma activa por acción de la enzima 2-aril-propionil-CoA epimerasa, en la que sólo un porcentaje se convertirá en S-ibuprofeno, como ya se mencionó anteriormente. A continuación, se realizan las reacciones oxidativas y de glucuronidación para formar acil-glucurónidos y la hidroxilación en la parte de la cadena ter-butilo y formar los metabolitos 1-,2- o 3-hidroxil ibuprofeno y de este último 3-carboxilibuprofeno. La formación de los metabolitos carboxilo e hidroxilo es catalizada por enzimas del grupo, citocromos P450. Los metabolitos de tipo carboxilo pueden ser glucuronidados y formar acil-glucurónidos, siendo esta la vía de detoxificación del fármaco y la formación de metabolitos inactivos (Rainsford, 2013).

Actualmente, el estudio de la actividad de este compuesto se ha enfocado desde el punto de vista de la farmacogenética y farmacogenómica; los factores genéticos afectan el perfil farmacocinético de un medicamento. Se considera como propósito de la farmacogenómica el utilizar pruebas que garanticen la optimización de farmacoterapia y poder ajustarla a las necesidades propias de cada individuo.

El ibuprofeno es metabolizado durante la fase I por enzimas polimórficas del tipo citocromo P450 (CYPs) y en la fase II mediante UDP-glucuronosiltransferasas. Durante la fase III participan los transportadores polimórficos que de acuerdo a las evidencias existentes modulan su toxicidad y eficacia (Krasniqi et al., 2016).

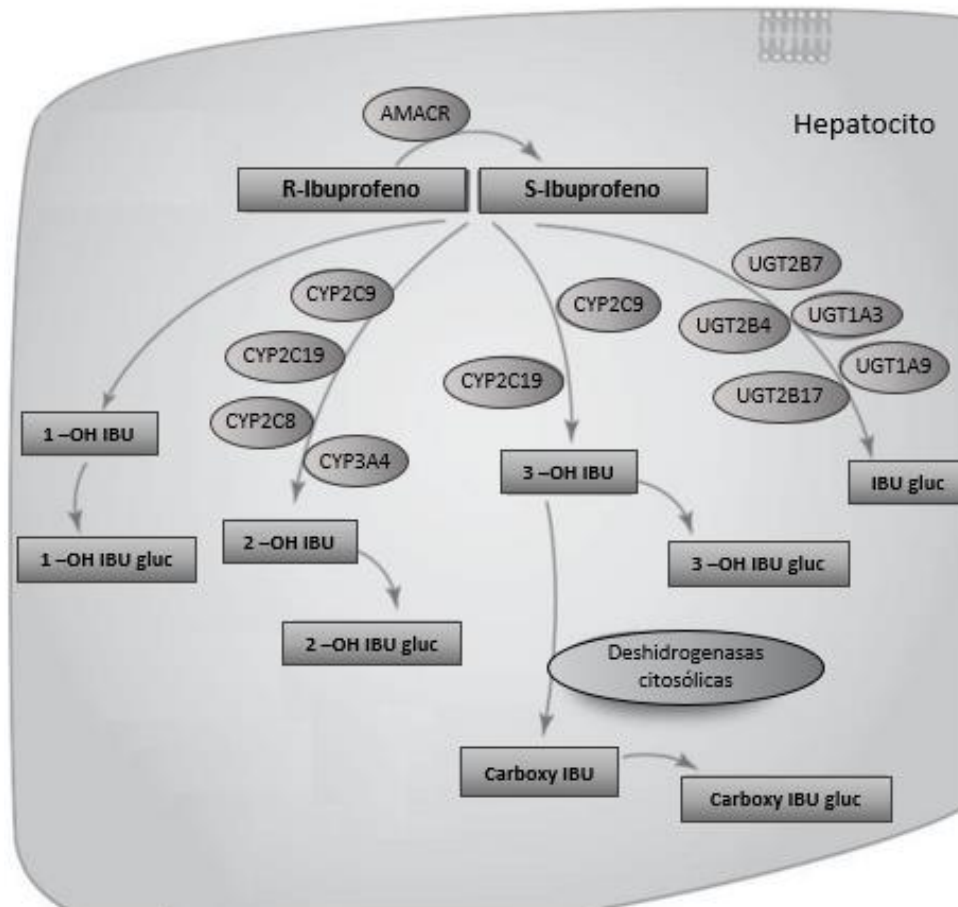
El metabolismo de ambos enantiómeros es complejo: para S-ibuprofeno es por oxidación mediante CYP2C9 y glucuronidación por UGT2B7, mientras que el principal mecanismo para R-ibuprofeno es la inversión quiral y para su remanente es la oxidación por CYP2C8 y posterior glucuronidación (Ochoa et al., 2015).

Más de cincuenta diferentes enzimas del tipo CYP se han identificado, de éstas cerca del 18-30% de la familia CYP2C se encuentran localizadas en hígado y de ellas se considera que el 50% son responsables de la eliminación de los fármacos, Todos los genes de la subfamilia *CYP2C* son polimórficos y entre ellos están *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18* y *CYP2C19*. Krasniqi et al., 2016).

CYP2C9 es la isoforma más importante en el aclaramiento del ibuprofeno, pues cataliza la formación de 2-hidroxi-ibuprofeno y 3-hidroxi-ibuprofeno, mayor parte de éste es convertido carboxi-ibuprofeno mediante deshidrogenasas citosólicas. En el metabolismo de R-ibuprofeno participa de manera preferente CYP2C8 en la formación de 2-hidroxi-ibuprofeno, mostrando estereoselectividad por este enantiómero, en la Fig. 4 se muestran las isoformas de CYP y UGT

que están involucradas en el metabolismo del ibuprofeno. En altas concentraciones de este fármaco, también contribuye CYP3A4 a través de la 2-hidroxicación y CYP2C19 en menor proporción. Se considera que cerca del 10 al 15% de una dosis de este fármaco se glucuronida de forma directa produciendo glucuronil acil-ibuprofeno (Ochoa et al., 2015).

**Figura 4. Metabolismo y transporte de ibuprofeno en el hígado.**



(Mazaleuskaya et al., 2015)

Experimentos *in vitro* mostraron que el ibuprofeno puede ser metabolizado por enzimas del grupo uridin 5'difosfoglucuronosil-transferasas (UTGs), dentro de las que se pueden citar UGT1A3, UGT1A9, UGT2B4, UGT2B7 y UGT1A10. UGT1A10 es la isoforma que se expresa de manera predominante en el intestino y también da como producto glucuronidacinil-ibuprofeno (Mazaleuskaya et al., 2015).

Ambas vías dependen del polimorfismo enzimático y la variabilidad étnica. Se han identificado los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) que caracterizan a cada una de las CYPs y UGTs involucradas en el metabolismo del ibuprofeno. Dentro de la raza caucásica, el 22% de los



individuos tienen mutaciones para el gen *CYP2C8* y el 31% para *CYP2C9* y un enlace entre los polimorfismos *CYP2C8* y *CYP2C9*.

Las variantes más frecuentes encontradas para el gen *CYP2C8* fueron las siguientes: \*2 (0-53%), \*3 (9.5–17%) y \*4 (4–8%). Estos genes se asociaron con una actividad enzimática reducida, con la excepción de *CYP2C8*\*3 sobre R-ibuprofeno. Con respecto a *CYP2C9* las mutaciones más frecuentes y también asociadas a una baja actividad enzimática fueron las siguientes *CYP2C9*\*2 y *CYP2C9*\*3. Dos tercios de la población estudiada expresan un genotipo silvestre *CYP2C9*\*1\*1, dentro esta distribución una tercera parte puede expresar tanto \*1/\*2 o 1/\*3\* y menos del 2.5% de los individuos expresan los genotipos \*2/\*2, \*2/\*3 y \*3/\*3. Debido a la alta frecuencia de variantes de *CYP2C8* y *CYP2C9* encontradas, podría ayudar a entender la variabilidad en la respuesta al tratamiento y el desarrollo de efectos adversos. Dado que, la presencia de polimorfismos reduce la actividad catalítica de *CYP2C8* y *CYP2C9*, esto se vería reflejado en los beneficios clínicos generados por el ibuprofeno (Ochoa et al, 2015).

Con respecto a los transportadores que participan en la incorporación celular de ibuprofeno, se ha demostrado que interactúa con diferentes tipos de transportadores los cuales podrían facilitar su incorporación y salida *in vivo* y si esto tendría influencia sobre su distribución y aclaramiento. Como se mencionó anteriormente, el ibuprofeno es un ácido débil liposoluble, por lo tanto; sería factible de que tuviera la capacidad de ser transportado a través de las membranas sin necesidad de utilizar un transportador específico (Davies, 1998).

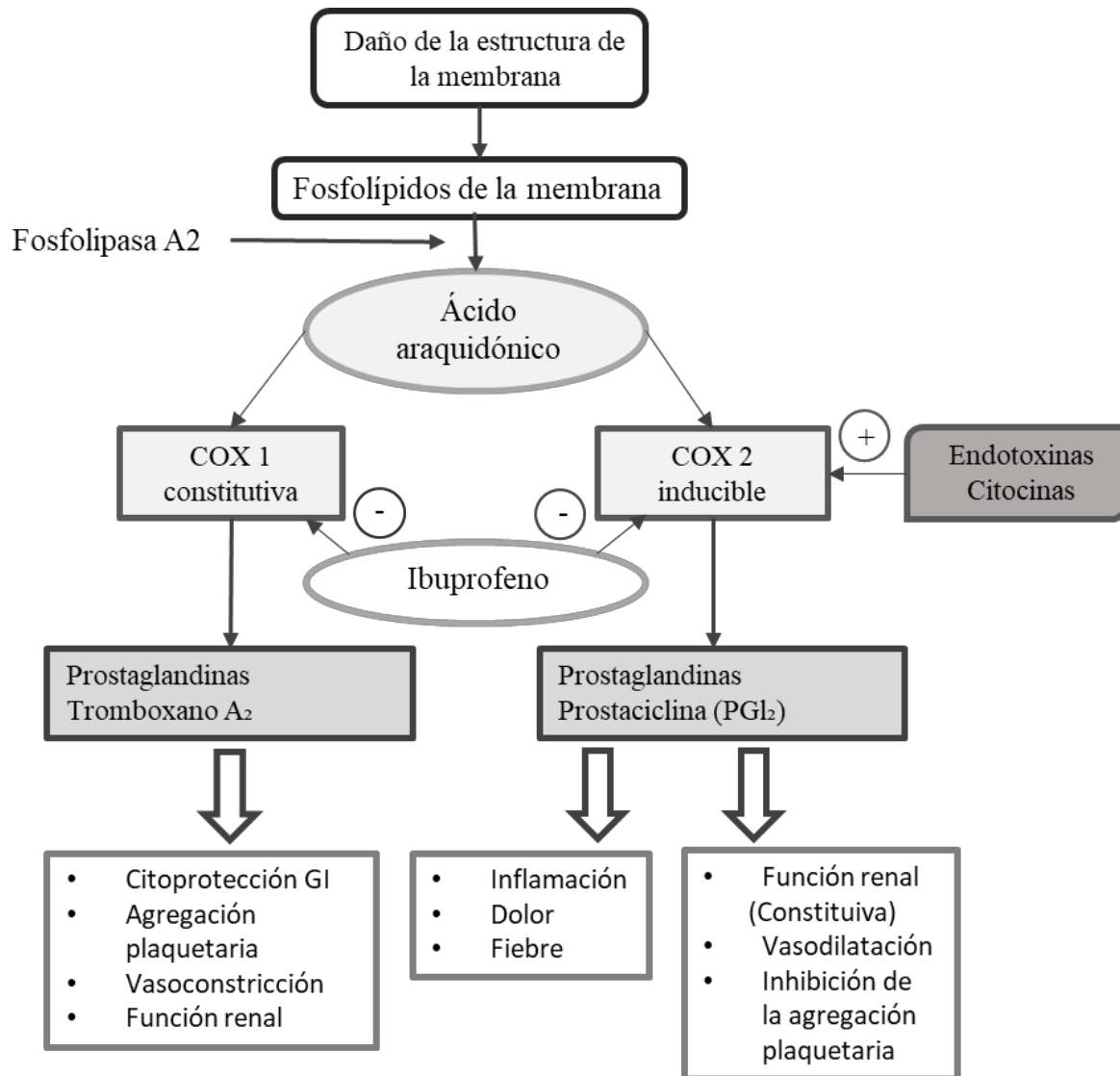
Sin embargo, esto podría adquirir relevancia clínica cuando este medicamento interactúa con otros fármacos. Mediante estudios *in vitro* se pudo establecer que el ibuprofeno puede ser sustrato para SLC22A6 (hOAT1 human Organic anion transporter 1) y SLC22A8 (hOAT3, human Organic anion transporter 3). Además, tiene la capacidad de inhibir varios transportadores dentro de los que se pueden citar SLC22A6 (hOAT1), SLC22A7 (hOAT2), SLC22A8 (hOAT3), SLC22A9 (hOAT4), SLC22A1 (Human Organic cation transporters 1, hOCT1), SLC15A1 (human Peptide transporter 1, hPEPT1), SLC5A8 (human Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1, hSMCT1) y SLC16A1 (Monocarboxylic transporter 1, MCT1) [Tamai et al., 1995; Khamdang et al., 2002; Itagaki et al., 2006; Chu et al., 2007; Omkvist et al., 2010].

### **2.2.1.3 Ibuprofeno y su acción sobre las ciclooxigenasas**

Seguido el descubrimiento de la ciclooxigenasa 2 (COX2), en 1999 aparecen los inhibidores selectivos de esta enzima, denominados “coxibs”. COX2 es enzima principal en la síntesis de

las prostaglandinas que se expresa en las vías de señalización de la inflamación y el dolor. (Rainsford, 2012).

**Figura 5. Modelo dual de la inhibición de las ciclooxigenasas.**

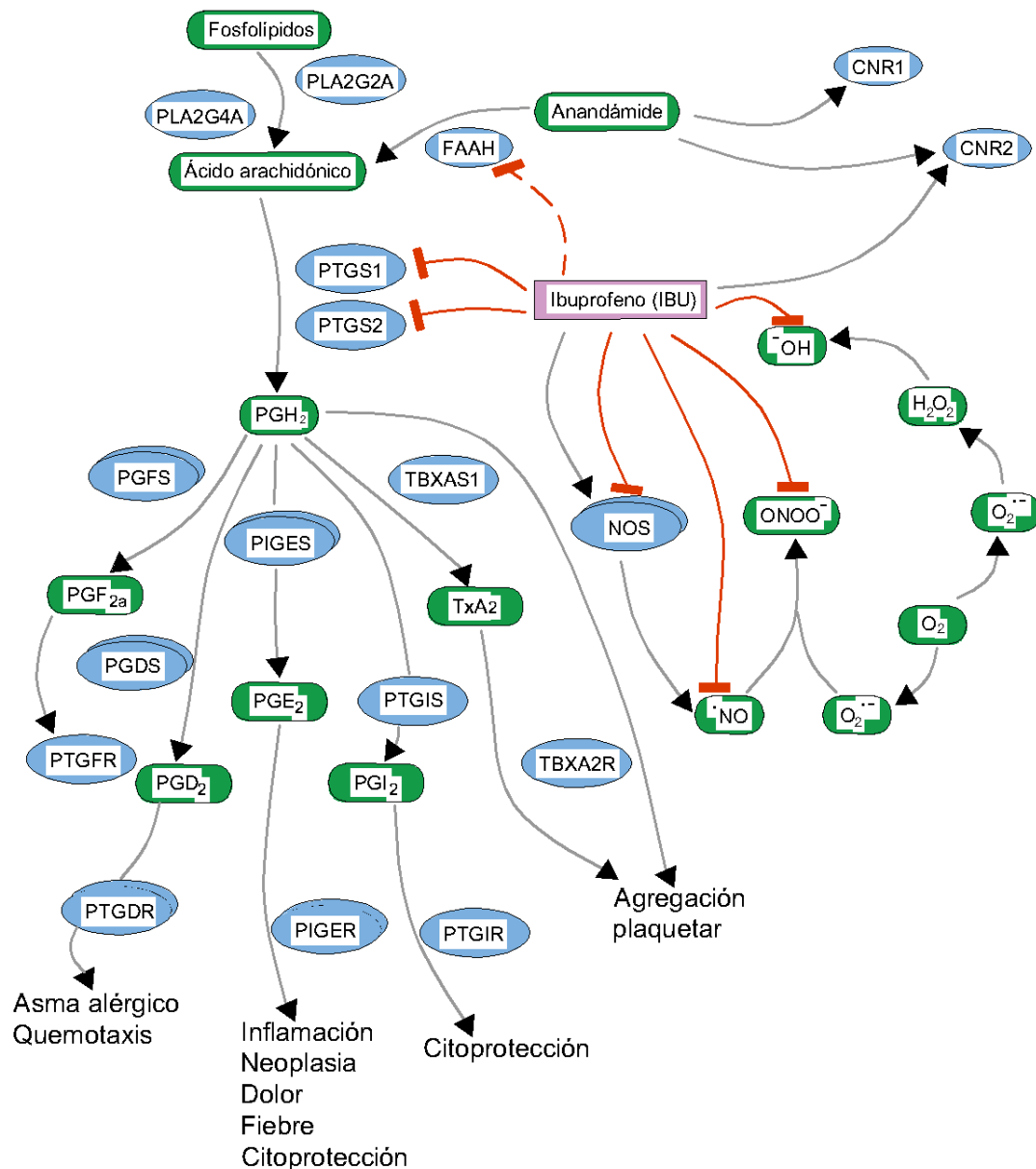


(Hersh et al., 2005)

Se ha documentado que el principal mecanismo de acción del ibuprofeno la inhibición reversible no selectiva de las enzimas Ciclooxigenasas 1 y 2 (COX1 y COX2). A través de estudios realizados *in vitro* se demostró que S-ibuprofeno es un inhibidor más potente que R-ibuprofeno sobre las enzimas COX (Davies, 1998). En experimentos *in vitro* utilizando sangre total humana, S-ibuprofeno demostró mayor capacidad inhibitoria sobre la actividad enzimática de

COX1 y COX2, en contraste con R-ibuprofeno siendo ésta 15 veces menor sobre COX1 y no mostró inhibición sobre COX2. COX1 y COX2 catalizan el primer paso en la conversión del ácido araquidónico en los prostanoides: prostaglandinas PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI (conocida como prostaciclina) y Tromboxano TX A<sub>2</sub>. Los prostanoides tienen una diversidad de efectos biológicos mediante la activación de receptores específicos y participan de manera primordial en una variedad de procesos homeostáticos y patológicos (Smyth et al., 2009).

**Fig. 6 Representación esquemática del mecanismo de acción del ibuprofeno.**



(Mazaleuskaya et al., 2015)

En la Fig. 6 se esquematiza como la liberación del ácido araquidónico es liberado de los fosfolípidos presentes en la membrana celular por la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que está codificada en el gen *PLA2G4A* citosólico y dependiente de calcio y el gen *PLA2G2A* localizado en las plaquetas y el líquido sinovial. Posteriormente, el ácido araquidónico es transformado en un compuesto inestable la prostaglandina H<sub>2</sub> mediante las prostaglandinas G/H sintetasa citosólica, también denominadas como ciclooxigenasas (COX), la cual se presenta en las isoformas COX1 y COX2, que se encuentran codificadas en los genes *PTGS1* y *PTGS2*, respectivamente. PGH<sub>2</sub> es utilizada como sustrato para la síntesis de varios prostanoides mediante sintetasas tisulares específicas, dentro de los cuales están PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, PGI<sub>2</sub> y TxA<sub>2</sub>, que actúan sobre receptores específicos y desencadenan varios efectos biológicos. PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> son prostanoides cuya característica es promover la generación de edema, aumentar la permeabilidad vascular y ayudar a la infiltración leucocitaria. PGE<sub>2</sub> es inhibida por ibuprofeno, éste es un prostanoides conocido por ser mediador en la piresis y su síntesis en el hipotálamo es estimulada por la presencia de citocinas, endotoxinas y moléculas sintetizadas por los leucocitos activados. Otro ejemplo de los efectos inhibitorios del ibuprofeno es sobre los prostanoides PGF<sub>2</sub>α and PGE<sub>2</sub> involucradas en los espasmos uterinos y el dolor inflamatorio en la denominada dismenorrea primaria (Dawood et al., 2007). Otra consecuencia de la administración de ibuprofeno, es la inhibición de la formación de TxA<sub>2</sub> previniendo así la vasoconstricción y la activación y agregación plaquetaria y finalmente la formación de coágulos, siendo esta un efecto transitorio y reversible (De la Cruz et al., 2010).

El síndrome de hipersensibilidad se desarrolla cuando el ibuprofeno se une a macromoléculas de alto peso molecular y forma haptenos. La hipersensibilidad es una combinación de eventos metabólicos e inmunológicos. La hapténización conduce a la activación de la respuesta inmunológica innata. La toxicidad mediante hipersensibilidad se caracteriza por niveles elevados de citocinas proinflamatorias dentro de las que se puede citar al factor de necrosis tumoral (TNF-α), esto puede ser usado como biomarcadores de susceptibilidad celular a fármacos (Neuman et al., 2007).

Estos biomarcadores pueden ser monitoreados por varios años después del episodio inicial. Como se ha mencionado anteriormente, la prostaglandina E<sub>2</sub> está involucrada en la regulación de la liberación de citocinas tales como: TNF-α, la interleucina-1 y la interleucina-6, siendo éstas las que controlan funciones metabólicas e inmunitarias. El papel del ibuprofeno es esencialmente conducir a una liberación mejorada y propagada de la citocina TNF-α mediante

la inhibición de la síntesis de la prostaglandina E2. El resultado de este efecto es incrementar la inflamación teniendo como consecuencia la disfunción orgánica (Nanau & Neuman, 2010). Todo esto va acompañado de la generación de grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las cuales contribuyen a la propagación del proceso inflamatorio y su fisiopatología (Kaplan et al., 1984; Valko et al., 2007).

Otro de los efectos del ibuprofeno es la inhibición del metabolismo del sistema endocannabinoide por medio de la anandamida (araquidonoiletanolamida) en el sistema nervioso central, cuya función es activar el eje antinoceptivo a través de los receptores (CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>) (Holt et al., 2007). Sin embargo, este mecanismo es aún incierto.

### **2.2.2 Paracetamol**

Una característica del paracetamol que ha sido documentada es que no tiene actividad antiinflamatoria ni inhibe la producción procoagulante del tromboxano. Al parecer, no es efectivo a nivel periférico; sino que su acción va dirigida principalmente a nivel central (Anderson, 2008)

Considerado como un analgésico y antipirético, teniendo en menor efecto antiinflamatorio (Högestat et al., 2005; Banerjee et al., 2015). Se ha reportado que penetra fácilmente el sistema nervioso (Botting et al., 2005), además existe evidencia de que el paracetamol participa en un sin número de mecanismos centrales, dentro de los cuales se pueden citar: efectos sobre la producción de prostaglandinas, así como las vías de señalización serotoninérgicas, opioide, cannabinoide y del óxido nítrico. Por lo tanto, se puede suponer que exista una interrelación de estas vías de señalización (Sharma et al., 2014; Klinger-Gratz et al., 2018).

#### **2.2.2.1 Paracetamol y el Sistema Icosanoide**

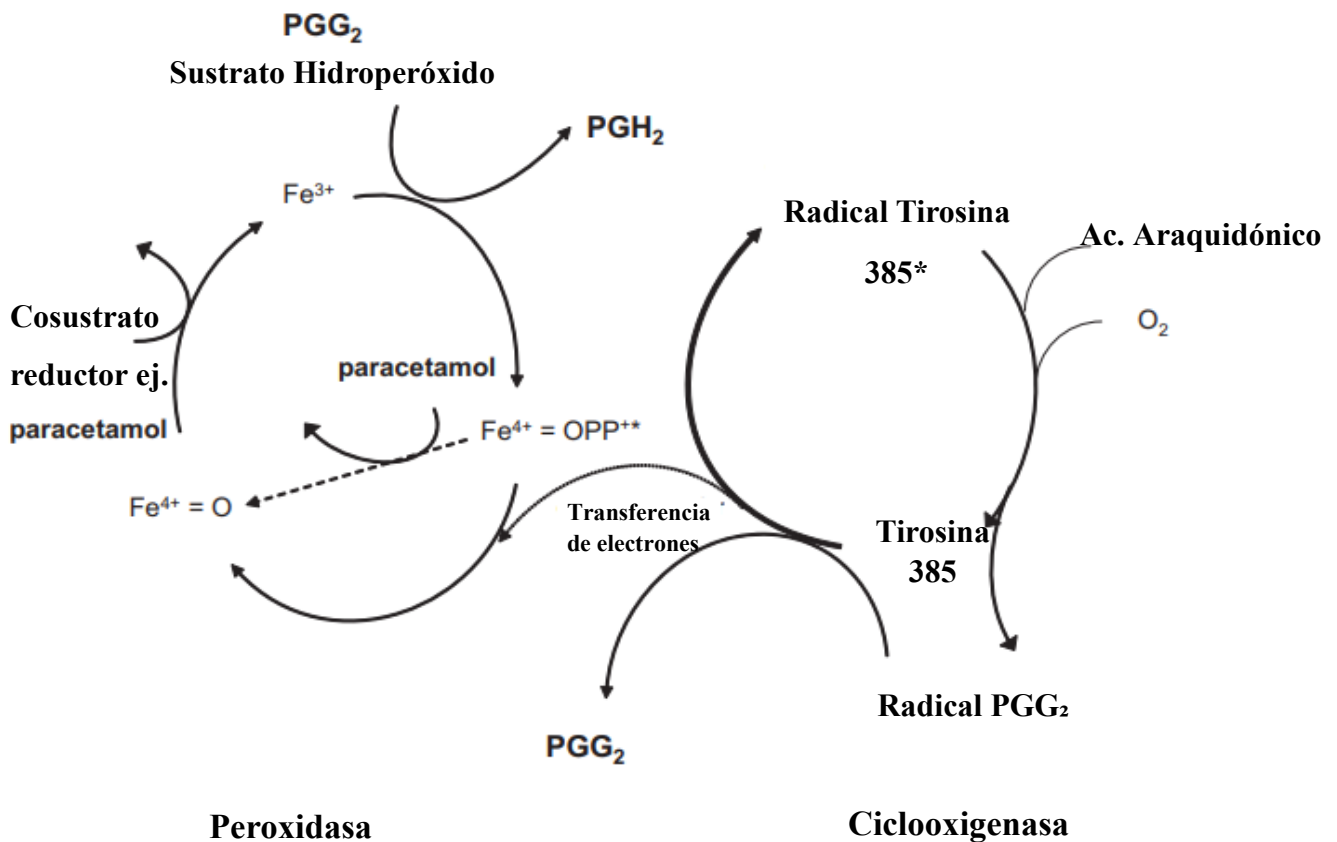
La prostaglandin H2 sintetasa, es responsable del metabolismo del ácido araquidónico, en sus 2 isoformas, conocidas como COX1(constitutiva) y COX2 (inducible). Esta enzima posee dos sitios activos: un sitio COX (ciclooxigenasa) y otro POX (peroxidasa). La actividad de COX se basa en que su forma oxidada es reducida por el paracetamol por acción del sitio POX. Otra alternativa sugiere la existencia de una variante de la prostaglandin sintetasa (COX3), presente en el sistema nervioso, que es finamente sensible el paracetamol, (Smith, 2009).

**Actividad del paracetamol en el sitio POX.** Como se ilustra en la Fig. 7, el ácido araquidónico (vía COX) reacciona con 2 moléculas de oxígeno PGG<sub>2</sub> y es reducida al adquirir dos electrones (vía POX). Esta reacción se lleva a cabo en dos sitios diferentes, POX tiene lugar

en un sitio activo que contiene un grupo Hem en una proteína de superficie y la reacción mediante COX se realiza en un canal hidrofóbico dentro del núcleo de la enzima. Ambos sitios son dependientes uno del otro, pero operan de forma independiente.

En la figura 4, se muestra la vía de interconexión de la actividad de COX y POX. La conversión del ácido araquidónico a PGG<sub>2</sub> es a través de la tirosina-385 en el sitio COX, la generación de este radical depende de la generación del catión Ferrol-porfirina IX en el sitio POX (Fe<sup>+4</sup>=FP). El paracetamol interfiere en este proceso actuando como un sustrato reductor en una reacción que reduce parcialmente a Fe<sup>+4</sup>=FP, de esta forma hay menos Fe<sup>+4</sup>=FP disponible para ser transferido al sitio COX. Por lo tanto, menos cantidad de tirosina-385 está disponible para la conversión del ácido araquidónico (Anderson, 2008; Smith, 2009)

**Figura 7. Mecanismo de inhibición de la ciclooxigenasa por el paracetamol**



(Anderson, 2008)

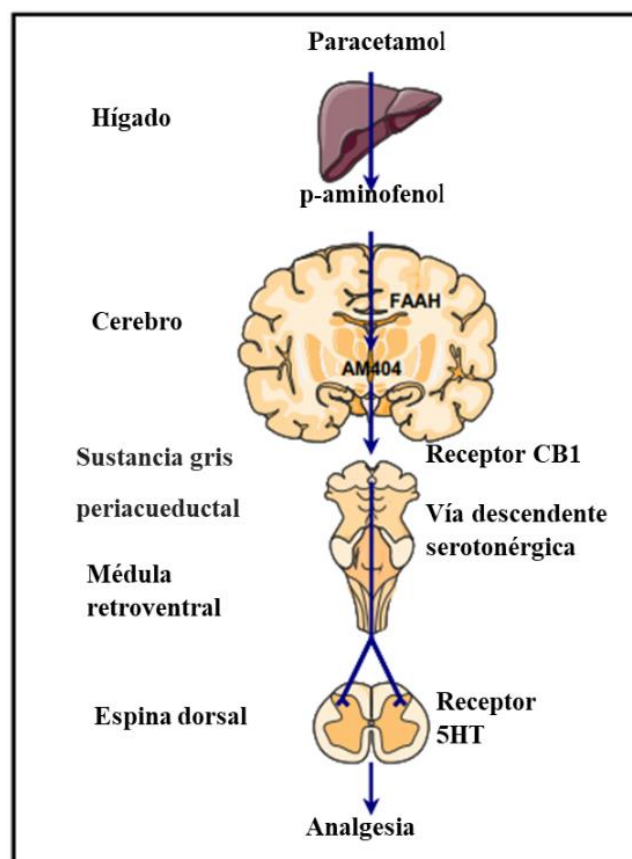
Existen reportes de la existencia de una variante derivada del mismo gen que codifica para COX1, muy sensible a la inhibición por paracetamol y denominada como COX3 y cuyo mRNA ha sido encontrado en el sistema nervioso central de animales de experimentación, incluyendo

corteza cerebral humana y apareció posteriormente en el hipocampo; esto ayudaría a explicar las acciones farmacológicas del paracetamol y otros fármacos analgésicos considerados como inhibidores débiles de COX1 y COX2 (Botting et al., 2005; Hersh et al., 2005).

### 2.2.2.2 Paracetamol y el sistema endocannabinoide

El paracetamol se conjuga con el ácido araquidónico (teniendo como vía intermedia el p-aminofenol formado en el hígado) en presencia de la enzima ácido graso amida hidrolasa, que se encuentra de forma predominante en el sistema nervioso central, obteniendo como producto el N-araquidonilfenolamina (AM404), ver Fig. 8. Este compuesto tiene una acción similar a los inhibidores de recaptación de serotonina o norepinefrina. Así AM404, inhibe la recaptación del endocannabinoide, anandamida, desde las hendiduras simpáticas, incrementando la acción sobre el receptor cannabinoide sobre la membrana post-sináptica. Esta sería la posible explicación a la relajación, tranquilidad y euforia experimentada por los pacientes que utilizan este fármaco. El AM404, al parecer participa en vías de señalización del dolor.

**Figura 8. Vía de conversión del paracetamol en AM404, un inhibidor de la recaptación endocannabinoide**



(Mallet et al., 2008; Sharma & Metha, 2014)

No sólo en la inhibición de la recaptación de endocannabinoides, sino también ha mostrado inhibir el potencial receptor transitorio vanilloide tipo 1 (TRPV1), el factor de necrosis tumoral Alpha ( $TNF\alpha$ ), la producción de NO, todos estos compuestos involucrados en las diferentes fases del dolor agudo o crónico. Al parecer el efecto del paracetamol sobre la producción a nivel central de AM404 tiene con su efecto antipirético, (Smith, 2009; Sharma et al., 2014)

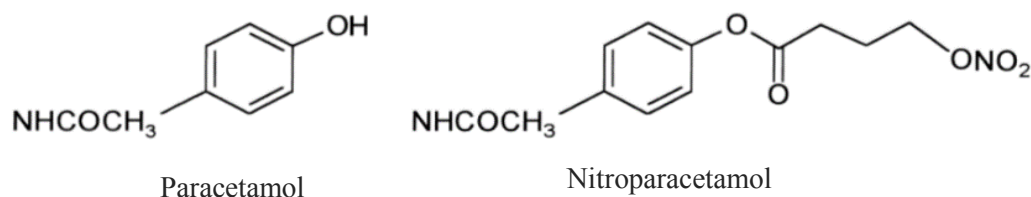
### 2.2.2.3 Paracetamol y el sistema serotoninérgico

El mecanismo de acción analgésico del paracetamol, es a través de 5HT (5-hidroxitriptamina) presente en varias estructuras del sistema nervioso central. Se ha postulado que la estimulación inducida por el paracetamol sobre los receptores 5HT conducen a un reforzamiento bulbo espinal en las vías inhibitoras descendentes a nivel supraespinal y el efecto analgésico depende de su impacto sobre la actividad de COX y el propio sistema de 5HT, modula la transmisión del dolor de manera muy compleja, entre los eventos descritos se encuentran la regulación ascendente de los receptores GH e IGF-1, los cuales participan en su actividad antinoceptiva. La interacción de este fármaco con el sistema serotoninérgico ha abierto la posibilidad de explicar sus interacciones con otros sistemas, como: el opioidérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, colinérgico y el sistema NO-sintetasa (Anderson, 2008; Smith, 2009).

### 2.2.2.4 Paracetamol y el Óxido Nitroso

Un derivado del paracetamol y el óxido nítrico, denominado como nitroparacetamol Fig. 9, muestra una potente actividad como antiinflamatorio y anti-noceptivo. Hay estudios que han demostrado que el nitroparacetamol inhibe la actividad de COX2, ejerciendo su actividad antiinflamatoria. En otros estudios realizados, sugieren que NO modula la actividad de NF- $\kappa$ B interfiriendo con la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B y/o por la inhibición de la afinidad unión de NF- $\kappa$ B-DNA, a través de la nitrosación de la subunidad p50.

**Figura 9. Estructura del paracetamol y el nitroparacetamol.**





Un mecanismo alternativo, propone la liberación de NO el cual contribuye a la actividad antiinflamatoria, a través de la inhibición de la caspasa 1, por la nitrosación de uno o más residuos de cisteína dentro de la molécula de la enzima, lo que conduce a la reducción de la producción de la interleucina-1 $\beta$ .

En lo que se refiere a su efecto sobre el dolor y la hiperalgesia, la actividad del nitroparacetamol, ha sido demostrado como un compuesto que inhibe el fenómeno espinal “wind-up” que caracteriza a la hiperalgesia. Otros efectos subyacentes de nitroparacetamol son que aumentan su efecto antinocepcivo tanto de comportamiento como electrofisiológico. Cuando NO es liberado del paracetamol, incrementa su efecto analgésico, acelerando su absorción, previniendo su catabolismo o incrementando su paso a través de la barrera hemato-encefálica, aumentando así la efectividad de este fármaco (Moore et al., 2003).

## **2.3 Consumo**

### **2.3.1 Ibuprofeno**

Uno de los medicamentos más prescritos en lo Estados Unidos, de acuerdo al reporte anual del Medical Expenditure Panel Survey que es conducido por la Agency Healthcare Research and Quality (AHRQ). El ibuprofeno se encuentra dentro de la lista de los 200 fármacos más importantes en el 2019, ocupando el lugar 35. De acuerdo a una encuesta realizada en el 2016, mostró que el número de prescripciones fue de aproximadamente 21 329 751 (Kane S.P., 2018). En un estudio conducido por Inotai et al., (2010), demostró que en seis países de Europa central y Este, el diclofenaco y el ibuprofeno son los compuestos más ampliamente utilizados como inhibidores no selectivos de COX2 (ciclooxigenasa 2) dentro del grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). En Asia los AINEs más consumidos en varios países son el diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y el ácido acetil-salicílico (Delaney et al., 2011). Siendo el consumo per capita de 0.34, en México, 2018 (<http://www.beta.inegi.org.mx/temas/estructura/>).

### **2.3.2 Paracetamol**

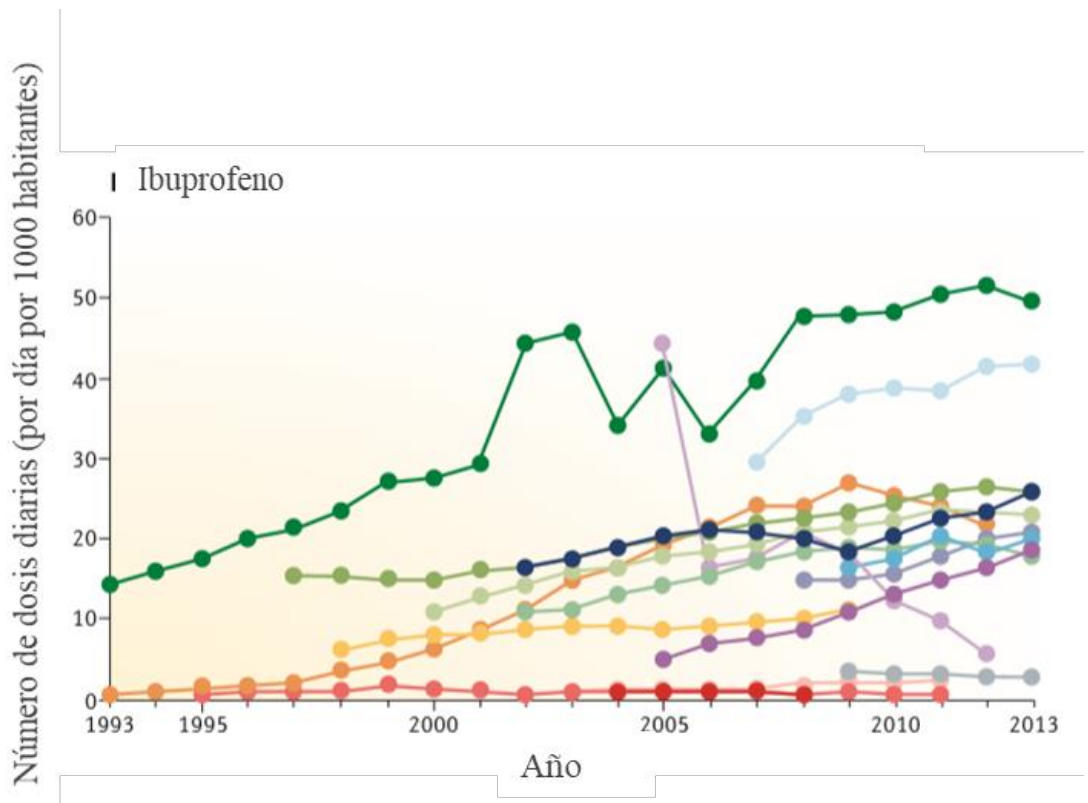
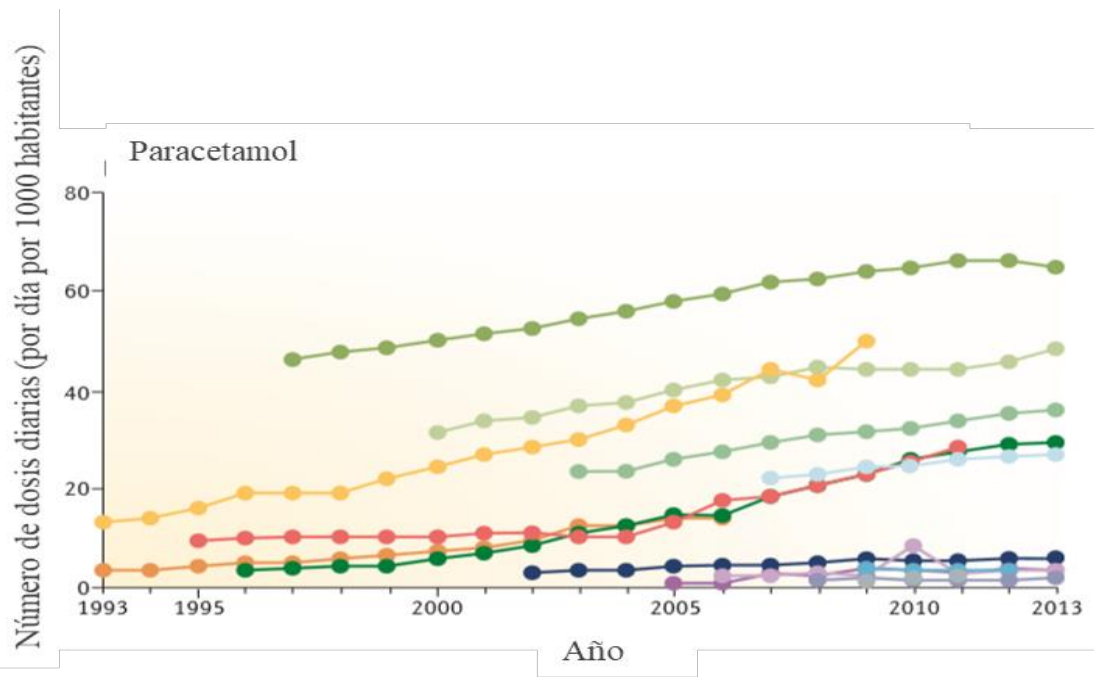
El paracetamol es uno de los fármacos más vendidos a nivel mundial debido a su eficacia y relativamente alta seguridad, cuya principal propiedad es aliviar el dolor. En el 2016 se demostró el alto impacto comercial de este fármaco, registrando ventas muy altas. Se reportó en el año 2018, que el 85.60% de la producción mundial de paracetamol en ese año fue principalmente en China con un 64.39% e India con el 21.22%. Algunos datos indican en el 2019, las ventas de paracetamol fueron de 740 millones de dólares y que las ventas para el 2023, alcanzarán el valor

de 780 millones de dólares (Acetaminophen Global Market Report, 2018). En un reporte elaborado por la OMS en Japón, lo identifica como un fármaco esencial y de primera línea para aliviar el dolor, por su eficacia y perfil de seguridad. En especial, por no presentar riesgos tales como trastornos gastrointestinales, disfunción renal, sangrados o eventos cardiovasculares. Sin embargo, hasta enero del 2011, aprobaron su uso y han aumentado el consumo del mismo (Kai, et al., 2013). Con lo que respecta a México en el 2018, se reportó un consumo per capita de 0.40 (<http://www.beta.inegi.org.mx/temas/estructura/>).

En un reporte elaborado en Europa (Kristensen, et al., 2016), muestra que las ventas de los analgésicos ibuprofeno y paracetamol, han ido aumentando continuamente en los últimos 20 años, ver Gráfica 1. Tomando en cuenta las diferencias en las tasas de consumo entre los diferentes países, éstas reflejan diferentes acciones para su comercialización, políticas gubernamentales, hábitos, accesibilidad, patrón de enfermedades y la distribución de edades de cada población. Serbia (2006) y España (2009) son la excepción, pues las ventas de ibuprofeno disminuyeron, ver Gráfica 1. Las diferencias en preferencias por estos fármacos en países con proximidad geográfica como Serbia y Croacia por el ibuprofeno o Noruega por ibuprofeno y Finlandia por el paracetamol, ilustra la influencia de las políticas y formas de comercialización dentro de los diferentes países. Otro ejemplo de ello sucedió en Suecia, en donde han estado disponibles desde el 2009 en puntos de venta diferentes a las farmacias, lo que disparó el consumo de paracetamol. Esta liberación en la venta, provocó que en Suecia aumentaran los casos de envenenamiento por analgésicos y los intentos de suicidio; esto quizá como resultado de la trivialización de su peligrosidad y fácil acceso. Por lo que finalmente en 2015, la Läkemedelsverket Medical Product Agency prohibió la venta del paracetamol en los supermercados suecos. El consumo sin prescripción se había estado realizando por cerca de 50 años en el caso del ibuprofeno y de 60 años para el paracetamol.

**Gráfica 1. Cambios anuales en las ventas de ibuprofeno y paracetamol**





(Kristensen, et al., 2016)

## 2.4 Ocurrencia

### 2.4.1 Ibuprofeno

Como consecuencia del alto consumo por la población a nivel mundial, esto favorece que los antiinflamatorios sean liberados al ambiente acuático por medio de los efluentes municipales, industriales y hospitalarios (Marchlewicz et al, 2015; Zur, et al., 2018).

Tabla 1. Ocurrencia de IBU en diferentes tipos de efluentes y sustratos en cuerpos de agua

País	Tipos de efluentes y sustratos en cuerpos de agua IBU concentraciones (µg/L)										Referencias
	WWTP Influyente (min-max)	WWTP Efluente (min-max)	Agua superficial (min-max)	Agua potable (min-max)	Lodos (min-max)	Mantos friáticos (min-max)	Influentes hospitalarios (min-max)				
Canadá	n.d.	0.077-2.051	0.007-0.790	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Metcalfe et al., 2003a
Canadá	14.8-75.8	0.3-24.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Metcalfe et al., 2003b
E.U.A.	9.5-14.7	0.010-0.022	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Thomas and Foster, 2005
Alemania	n.d.	n.d.	ND-2.383	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Meyer et al., 2011
Grecia	0.096-403	5x10 <sup>3</sup> -0.262	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.254-0.574	n.d.	Samaras et al., 2010
India	n.d.	n.d.	ND-0.200	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Shannugam et al., 2014
Irán	0.233-1.051	0.031-0.045	0.022-0.37	0.021-0.047	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Eslami et al., 2015
Letonia	n.d.	n.d.	0.004-0.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Reinholds et al., 2017
Noruega	n.d.	n.d.	0.001-0.005	0.001-0.009	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Reinholds et al., 2017
Portugal	n.d.	n.d.	ND-0.222	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Lolic et al., 2015
Sudáfrica	n.d.	n.d.	0.107-0.516	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Archer et al., 2017
Corea del Sur	n.d.	n.d.	ND-0.414	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Kim et al., 2009
España	n.d.	0.433-2.633	2.358-11.891	0.029-0.571	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Heath et al., 2010
Suecia	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.115-0.129	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Sagrístia et al., 2010
Suecia	n.d.	n.d.	ND-0.818	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Daneshvar et al., 2012
Suiza	0.0990-3.300	0.013-0.081	0.001-0.007	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Buser et al., 1999
Taiwán	n.d.	n.d.	ND-4.350	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Yu-Chen Lim et al., 2010

n.d. = no disponible; ND = no detectado

Diversos estudios han detectado la presencia de ibuprofeno en influentes y efluentes provenientes de las plantas de tratamiento, agua superficial, agua potable, lodos y efluentes hospitalarios. Las concentraciones de ibuprofeno reportadas van del rango de 0.001 hasta 75.8  $\mu\text{g/L}$ , en diferentes efluentes a través de todo el mundo. En la Tabla 1, se muestran las concentraciones reportadas en diferentes tipos de efluentes y sustratos en cuerpos de agua.

Para determinar las concentraciones de este trabajo también se tomaron en consideración estudios de toxicidad realizados bajo condiciones controladas, utilizando para ello bioindicadores tales como *C. carpio* y *D. magna* para evaluar estrés oxidativo (Gómez-Oliván et al., 2014c, 2014a; Heath et al., 2010; Islas-Flores et al., 2017, 2014; Kimmel et al., 1995; Kolpin et al., 2002; Metcalfe et al., 2011, 2003a; Meyer et al., 2011).

#### **2.4.2 Paracetamol**

Al igual que el ibuprofeno, este antiinflamatorio es uno de los más consumidos. Como una consecuencia de su incompleta degradación, grandes cantidades de paracetamol son encontradas en diferentes matrices ambientales, dentro de las que se pueden citar: ríos, suelos, lixiviados, desagües, efluentes procedentes de plantas de tratamiento, tablas de agua y agua potable. Como todos los contaminantes emergentes sus valores varían desde los  $\text{ngL}^{-1}$  hasta los  $\mu\text{L}^{-1}$  (Joss et al., 2006; Murray et al, 2010; De Luna et al., 2012; Kawabata et al., 2012; Kunkel and Radke, 2012; Nunes et al., 2014; Li et al., 2015; Petrie et al., 2015; Rivera-Jaimes et al., 2018) Tabla 2. Para realizar los estudios de exposición de los ovocitos de la carpa común *Cyprinus carpio* se consideraron los reportes de ocurrencia realizados en diversos países y que se encuentran concentrados en la Tabla 2, que se muestra a continuación.

Tabla 2. Ocurrencia de PCM en diferentes tipos de efluentes y sustratos en cuerpos de agua

País	Tipos de efluentes y sustratos en cuerpos de agua. PCM concentraciones (µg/L)							Referencias
	WWTP Influyente (min-max)	WWTP Efluente (min-max)	Agua superficial (min-max)	Agua potable (min-max)	Lodos (min-max)	Efluentes hospitalarios (min-max)		
Inglaterra	NA	NA	55	NA	NA	NA	NA	Bound et al., 2006
República de Corea	3.540 - 10.234	0 - 0.027	NA	NA	NA	NA	NA	Behera et al., 2011
E.U.A (Georgia)	NA	NA	37 - 130	NA	NA	NA	NA	Yang et al., 2011
Arabia Saudita	99.6	90.5	NA	NA	NA	NA	NA	Shraim et al., 2012
	0.081 - 9.286	0.083 - 0.106	NA	NA	NA	NA	Universidade: 13.03 - 58.86	
Portugal (Coimbra)							General: 12.56 - 47.14 Pedriátrico: 2.27 - 57.143 Maternidad: 0.211 - 13.986	Santos et al., 2013
Portugal (Ríos)	NA	1.63 - 3.57	Glucurónido-paracetamol hasta 462	NA	NA	NA	NA	Santos et al., 2013a
			p-aminofenol debajo de 1.63					
Corea del Sur	NA	NA	NA	NA	90.3 ng/g industrial	NA	NA	Subedi et al., 2014
					56.6 ng/g doméstico			
					68.5 ng/g mezcla			
Canada	36 - 500	0.16 - 62	NA	NA	0.014 - 0.015	NA	NA	Guerra et al., 2014
E.U.A. (Sureste)	NA	NA	0.19 - 0	0 - 0	NA	NA	NA	Padhye et al., 2014
India	Min 21.126 ± 1.671 Max 134.322 ± 32.419	Min ND Max 0.058 ± 0.012	NA	NA	NA	NA	NA	Mohapatra et al., 2016
República Checa	0.35 - 180	< 0.010 - 13	NA	NA	NA	NA	NA	Vymazal et al., 2016
Grecia	NA	NA	Primavera ND - 0.155 Verano 0.063 - 2.51 Otoño 1.68 - 2.316 Invierno 1.48 - 2.452	NA	NA	NA	NA	Papageorgiou et al., 2016
			Río abajo 0.064 Río arriba 0.021	NA	NA	NA	NA	Archer et al., 2017
Sudáfrica (Ríos)	NA	NA	0.075	NA	NA	NA	NA	Yao et al., 2018
China (Shanghai)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Wang et al., 2018
China (Xiamen)	7.9 x 10 <sup>6</sup>	4.37 x 10 <sup>6</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	Kanama et al., 2018
Sudáfrica (provincias noroeste)	21.27 - 119.50	ND - 11.39	NA	NA	NA	NA	NA	Rivera-Jaimes et al., 2018
Mexico (Cuernavaca)	2.3 - 14.9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	NA	N	Execution rocks: 0.029 Light house: 0.07 Railway bridge: 0.06 Daymark: 0.09	NA	NA	NA	NA	Cantwell et al., 2019
E.U.A (Long Island)								
Suecia (Estocolmo)	NA	NA	0.159	NA	NA	NA	NA	Lindim et al., 2019

NA= no aparece; ND=no detectado;

## **2.5 Toxicidad**

Los analgésicos de actividad leve como el ibuprofeno y paracetamol, clásicamente han sido usados para aliviar la fiebre y malestar leve, en el contexto del parto prematuro, en las enfermedades inflamatorias y dolor en las musculoesqueléticas crónicas. Con respecto a su uso durante el embarazo, desde el año 2010, se ha puesto atención en su posible participación en la generación de malformaciones congénitas como la criptoquidia e hipospadia como resultado a la exposición a estos fármacos durante la vida intrauterina. En el año 2015, también se publicó que el sistema endócrino y reproductor pueden ser vulnerables durante la vida adulta, en ambos sexos a estos medicamentos (Christensen, et al., 2016).

### **2.5.1 Toxicidad del Ibuprofeno**

Uno de los eventos adversos provocado por este fármaco es la isquemia cardiovascular, esto hace relevante el identificar su toxicidad. Dentro de los que se pueden mencionar: el sangrado gastrointestinal, falla cardíaca, daño hepático, hipertensión y muerte. Esto es de vital importancia en pacientes que reciben ibuprofeno de forma crónica y que son del grupo de edad avanzada y que tienen múltiples comorbilidades (Solomon et al., 2017)

Aunque en la mayoría de los pacientes es un medicamento seguro, se ha encontrado en algunos casos produce una verdadera hipersensibilidad que es una enfermedad sistémica, caracterizada por una triada que incluye fiebre, erupción y órganos internos; que empieza en un periodo de 1 día a 12 semanas después de iniciada la terapia. Este síndrome asociado a la administración de ibuprofeno, es una reacción al medicamento dependiente del huésped y es idiosincrático por su naturaleza. Esta reacción es causada probablemente por la combinación de factores metabólicos e inmunológicos. Factores inmunológicos mediados por células T y sus productos como las citocinas y quimiocinas, que pueden exacerbar la respuesta celular y conducir a una variedad de manifestaciones clínicas (Nanau et al., 2010).

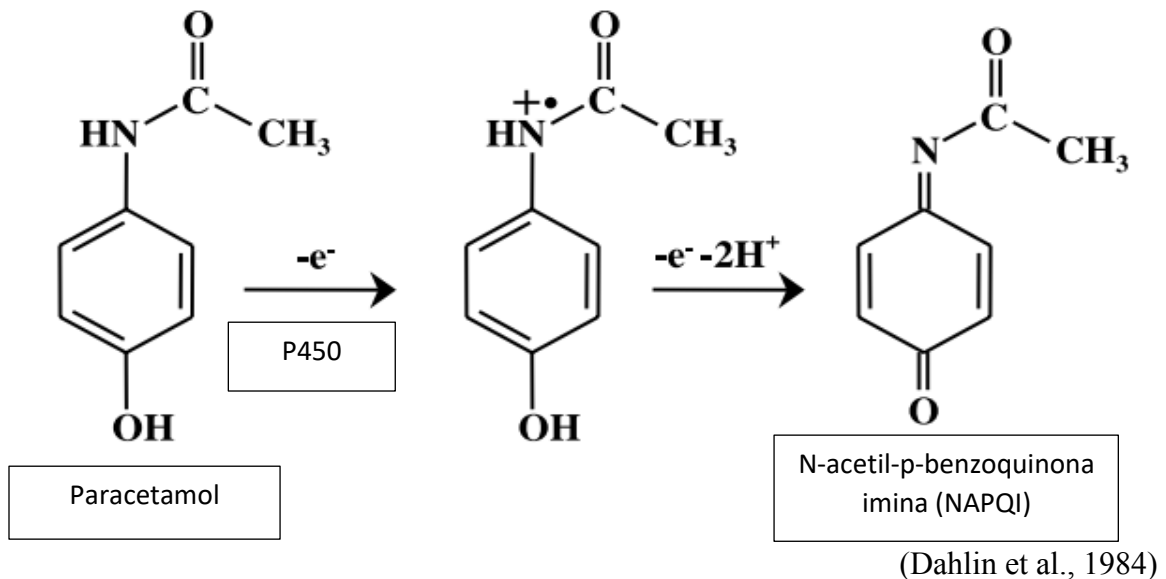
### **2.5.2 Toxicidad del Paracetamol**

Las primeras 24 horas son críticas para identificar los datos clínicos no específicos de la toxicidad de este medicamento y que considerada la primera fase. Son caracterizados por náuseas, vómito, anorexia, palidez y letargia. Durante la segunda fase se manifiestan datos clínicos y de laboratorio correspondientes con hepatotoxicidad. Tradicionalmente se considera que hay un periodo latente que comprende de las 24 hasta las 48 horas en que se manifiesta la disfunción hepática, pero algunos autores han encontrado que las enzimas hepáticas se elevan

desde las primeras 24 horas. La tercera fase progresa hacia la falla hepática fatal con todas las complicaciones asociadas. Finalmente, en la cuarta fase que ocurre dentro de las 72 a 96 horas se resuelve la función hepática y el paciente se recupera, en caso de que sobreviva. Esto sucede en los casos de ingestión intencional de sobredosis (Rowden et al., 2005)

Hay poblaciones que presentan factores de riesgo para desarrollar hepatotoxicidad al paracetamol. Este fármaco es administrado generalmente en su forma conjugada como glucurónido o sulfato que forman metabolitos no tóxicos. El paracetamol es metabolizado por el citocromo P450 hepático a un metabolito tóxico, el N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI). El mecanismo propuesto por Dahlin et al., 1985, se ilustra en la Fig. 10, en él dos electrones producto de la oxidación del paracetamol y su posterior deshidratación de como producto final a NAPQI.

**Figura 10. Mecanismo de formación de NAPQI.**



Este producto es detoxificado por Glutación (GSH) a metabolitos no tóxicos. Cuando hay una sobredosis de paracetamol sobrepasa la vía de conjugación y junto con la depleción de GSH trae como consecuencia el daño hepático (Thummel et al., 2000; Rumack et al., 2004).

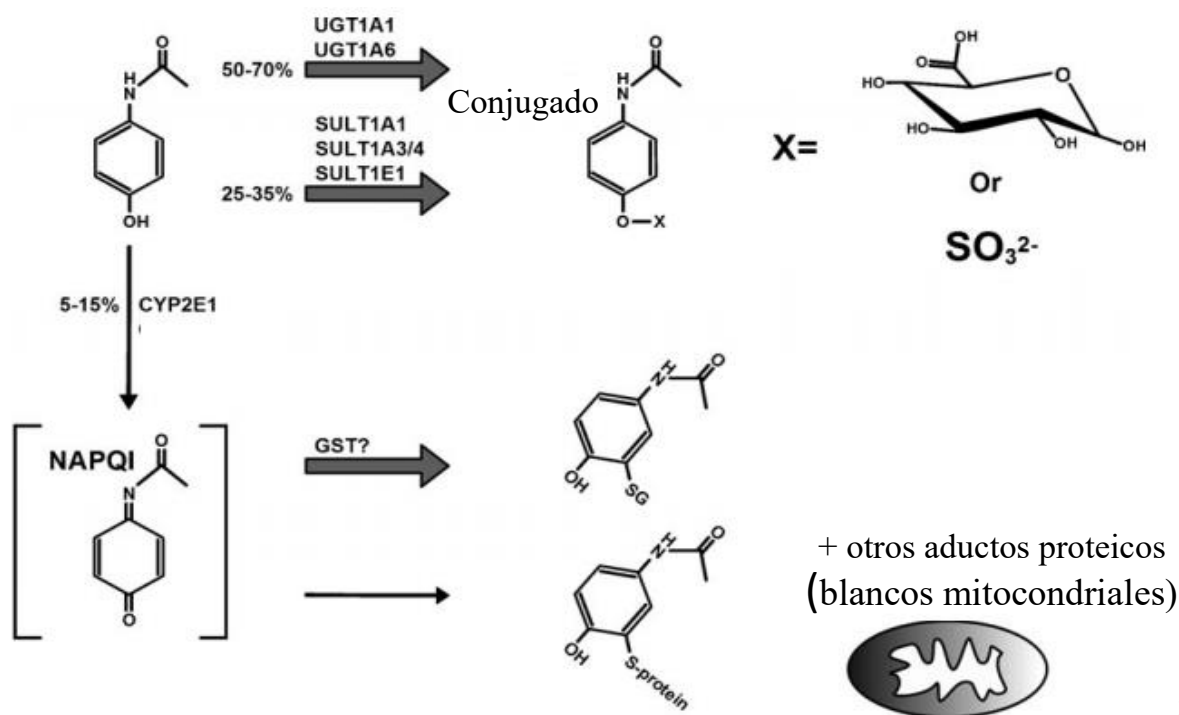
En el caso de los pacientes alcohólicos, la ingestión de alcohol incrementa la actividad de p450 y le permite al hígado metabolizar mayor cantidad de paracetamol y en consecuencia aumentar la cantidad de NAPQI. De esta forma los pacientes alcohólicos presentan menor cantidad de GSH y tienen un riesgo cinco veces mayor de desarrollar encefalopatía hepática (Zao et al., 2002).



La formación de NAPQI en la parte inicial del metabolismo del paracetamol, da por resultado la unión de este compuesto a proteínas hepato-celulares para formar aductos del tipo 3-(cistein-S-ilo)-paracetamol, Fig 11. La reacción espontánea de NAPQI y el glutatión se realiza vía de la adición de Michael a la par de una reacción redox dando una menor cantidad de paracetamol y disulfuro de glutatión. Varios tipos de glutatión transferasas catalizan ambas reacciones, (Josephy, 2005)

La eliminación del paracetamol ocurre principalmente en el hígado, lugar en el cual ocurre la mayor parte de la generación de conjugados glucurónidos y se considera que entre el 50-70% del fármaco administrado se elimina de esta forma. Sin embargo, la cantidad se conjugados sulfatados solo asciende a un 25-35%, para su posterior excreción a través del riñón. Las glucuronosil-transferasas que han sido descritas que participan en la formación de los conjugados, pertenecen a cuatro familias que son las siguientes: UGT1, UGT2, UGT3 y UGT. La sulfatación de este fármaco es catalizada por sulfotransferasas (SULT). Estas enzimas transfieren un grupo a partir de 3'-fosfoadenosina-5'fosfosulfato a un aceptor del tipo paracetamol. La sulfatación se realiza en el citosol en el aparato de Golgi, pues estas enzimas actúan sobre sustratos grandes como las proteínas. Las sulfotransferasas hepáticas que participan en la eliminación de xenobióticos son SULT1A1(sulfotransferasa termolábil) y 1A3/4 (sulfotransferasa termoestable) (McGill y Jaeschke, 2013).

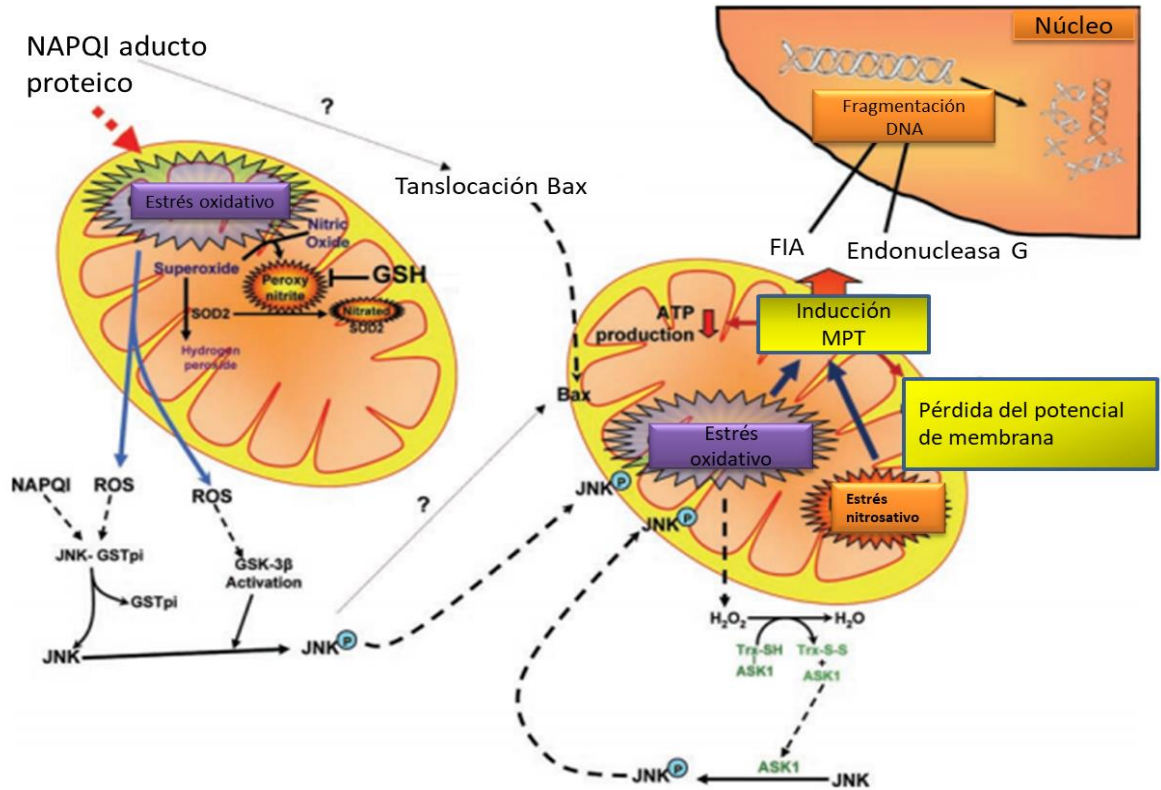
**Figura 11. Formación de aductos proteicos**



Dentro de los aductos proteicos mitocondriales se encuentran: modificación a la estructura de la Glutación peroxidasa, reduciendo su actividad antioxidante y la fracción  $\alpha$  (Alpha) de la adenosin trifosfato sintetasa, la cual sería parcialmente responsable del decremento en la síntesis de ATP. Esta unión a proteínas por parte de NAPQI, ocasiona estrés oxidativo mitocondrial y toxicidad. Otra forma en que el paracetamol puede inducir estrés oxidativo es mediante el Factor inductor de apoptosis (AIF), pues funciona como la NADH oxidasa y regula la actividad del complejo I mitocondrial, Fig. 12.

Otro mecanismo implicado en la toxicidad del paracetamol es la producción del peróxinitrato ( $\text{ONOO}^-$ ) un oxidante muy potente altamente reactivo y especies nitrantes. El peróxinitrato es generado en las mitocondrias de los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales y forma aductos proteínicos de nitrotirosina; el peróxinitrato formado en la mitocondria conduce a la nitración de proteínas presentes en dicho organelo como es el caso de SOD2, que en presencia de su forma nitrada se observó un incremento del peróxinitrato y la formación de proteínas carboniladas. Además, daña el DNA mitocondrial y provoca la formación de especies reactivas de oxígeno. El aumento de los niveles de GSH limpia el peróxinitrato y mejora la detoxificación de peróxido de hidrógeno. La amplificación del estrés mitocondrial y la formación de peróxido de hidrógeno se manifiesta como resultado de la activación de la cJun N-terminal cinasa (JNK), aunque no se ve afectada directamente por EROs, el paso sensible a Redox, al parecer, es la disociación de la Tio redoxina (TRx) y la cinasa reguladora de la señal de apoptosis-1 (ASK1) que dispara su activación.

**Figura 12. Estrés oxidativo inducido por paracetamol y su influencia sobre la señalización celular.**



(Jaescke et al., 2012)

La liberación de JNK de Glutación S transferasa pi (GSTpi) puede ser el resultado del estrés oxidativo o de la unión directa con NAPQI. De forma alternativa, la glucógeno sintetasa cinasa 3β es activada al inicio de la hepatotoxicidad inducida por el paracetamol. Independientemente del mecanismo de activación de JNK se dirige a la translocación mitocondrial de bax y JNK-P, promoviendo incremento en el estrés oxidativo y la formación de peróxinitrato adyacente al daño al ADN mitocondrial y la pérdida parcial de la actividad de enzimas mitocondriales por la oxidación y nitración de grupos tiol. Siendo el efecto más crítico, la apertura del poro de transición de la membrana mitocondrial (MPT) provocando el colapso del potencial de membrana y el cese de la síntesis de ATP. La translocación al núcleo de AIF y la endonucleasa G, produce condensación de la cromatina y fragmentación a gran escala del ADN, siendo éste un evento importante en el daño celular provocado por el paracetamol. Sin embargo, la translocación de bax mitocondrial conduce a la permeabilización de la membrana externa

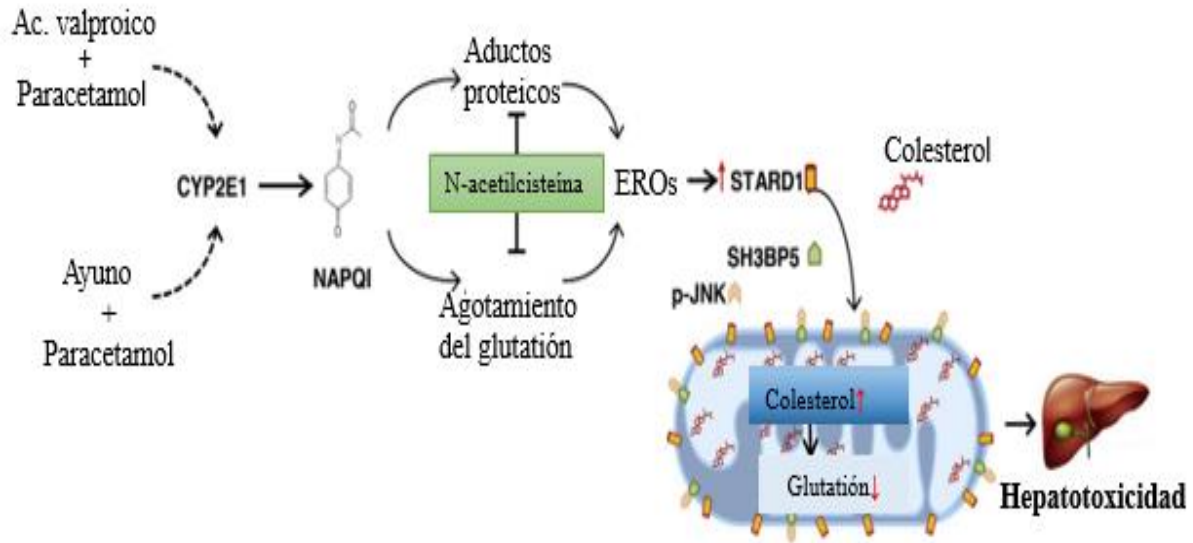
mitocondrial (MOMP) y la liberación de proteínas intermembrana. Más aún, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo son los reguladores centrales de la muerte celular inducida sobredosis de paracetamol y siendo ésta la causa de la necrosis oncótica (Jaescke et al., 2012).

Sin embargo, el daño hepático agudo producido la esteatohepatitis no alcohólica relacionada con la obesidad y la diabetes tipo 2 finalmente evoluciona a cirrosis. Este evento conduce a daño hepatocelular y es el factor que promueve la inflamación y fibrosis. La muerte hepatocelular se debe principalmente a la presencia de ácidos grasos libres saturados como lo es el ácido palmítico, caracterizados por ser más tóxicos que los insaturados, a este fenómeno se le conoce con el nombre de lipotoxicidad o lipoapoptosis (Win et al., 2015).

En base a este conocimiento, Torres et al., (2019) utilizando mitocondrias de ratones a los que se les había suministrado ácido valproico (para la sensibilización) con paracetamol y otro grupo de ratones sometidos a ayuno y la administración de paracetamol, con el objetivo era estudiar la participación de P450 (isoforma CYP2E1), el receptor SAB (SH3BP5), el receptor mitocondrial de colesterol (STARD-1) y la fosforilación de JNK (cinasa N-terminal c-JNK) como mediadores de los efectos hepatotóxicos del paracetamol, Fig. 13.

Demostró que en el primer caso se incrementó la expresión de CYP2E1, la formación de aductos proteicos-NAPQI y el agotamiento del glutatión en el tejido hepático, lo que generó estrés en el retículo endoplásmico y una sobre-regulación de STARD-1 (proteína reguladora esteroideogénica aguda-1) el transportador mitocondrial de colesterol y la acumulación de éste que va acompañada del agotamiento del glutatión y la disfunción mitocondrial. La velocidad en la síntesis de NAPQI puede sobrepasar la velocidad del glutatión para formar conjugados mercaptúricos no tóxicos. Debido a que todas las quinonas pueden generar especies reactivas de oxígeno por medio del ciclaje redox, las quinonas parcialmente sustituidas pueden producir arilación y formar aductos de Michael por medio de enlaces con nucleófilos, teniendo como ejemplo de ellos los cisteinil-tioles.

**Figura 13. Hepatotoxicidad mediada por paracetamol en hígado graso.**



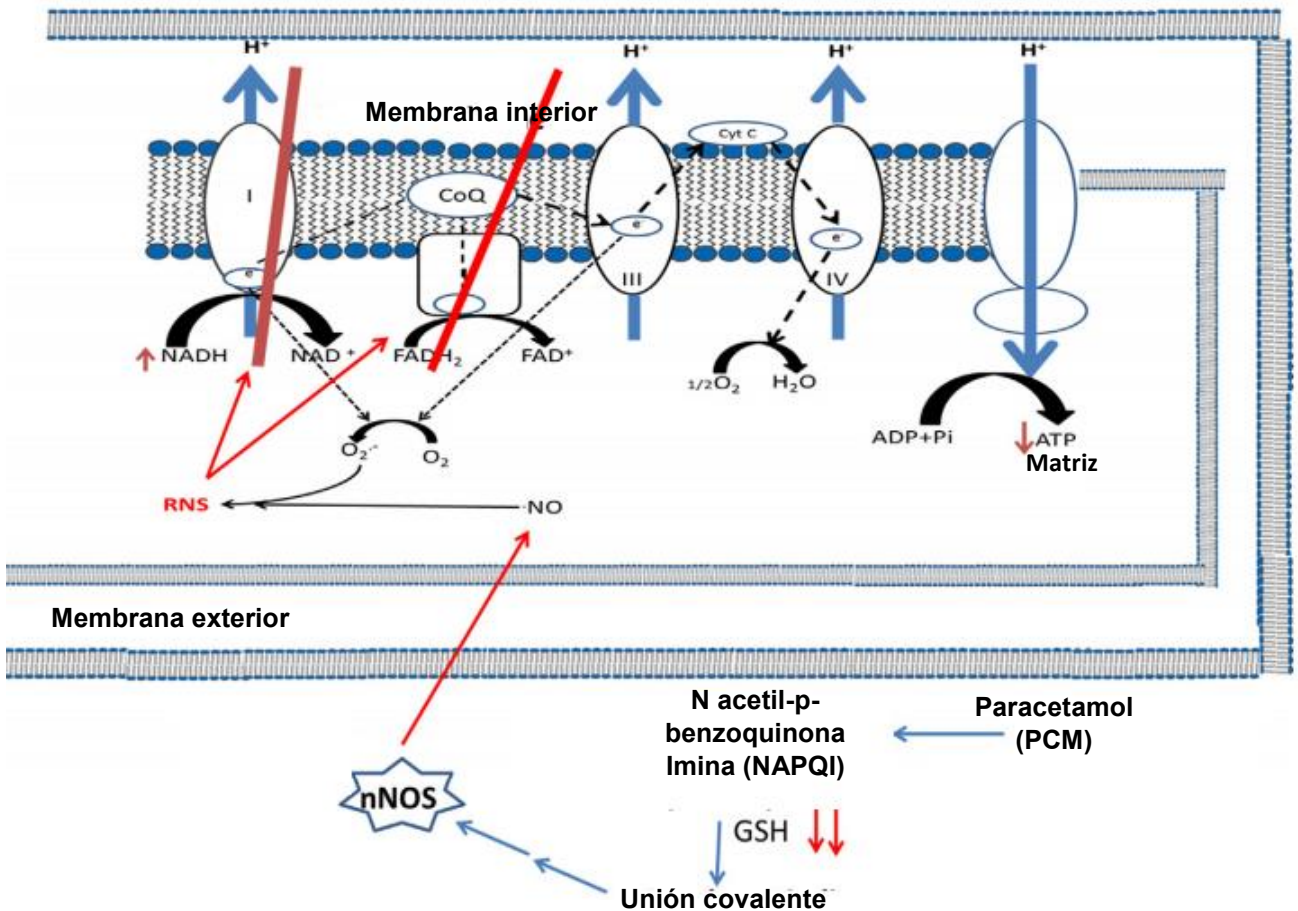
(Torres et al., 2019)

Ahora bien, la interacción entre las moléculas mencionadas parece ejercerse por lo menos en 2 niveles: 1. Donde JNK es necesario para la expresión de STARD1, que posiblemente sea por la inducción de estrés en el retículo endoplásmico; 2. Que la activación de JNK mitocondrial depende de STARD1. Sin embargo, se necesitan más estudios para establecer el papel de cada una de las moléculas citadas en esta investigación.

Adicionalmente, a la formación de aductos proteicos con la cisteína, la unión a la tirosina al nitrato forma 3-nitrotirosina en los hepatocitos centrilobulares, desarrollando necrosis. La 3-nitrotirosina es formada por la reacción de nitración de la tirosina y el peróxinitrito, una especie altamente reactiva, nitrante y oxidante. Se reporta la nitración de MnSOD, la deshidrogenasa aldehído mitocondrial, glutatión peroxidasa, ATP sintetasa, Tiolasa 3-cetoacil-CoA. Al parecer NO es un mediador en el aumento de la reactividad del oxígeno. Se determinó que hay un aumento de NADH en la mitocondria de los hepatocitos, que resulta en su acumulación a consecuencia de la toxicidad del paracetamol y debido al bloqueo del flujo de electrones en la mitocondria, Fig. 14. Así mismo se encontró que, los hepatocitos tratados con paracetamol muestran una disfunción del complejo I mediada por especies reactivas de nitrógeno y es

altamente sensible a ellas. Existen estudios que han mostrado no sólo el bloqueo del complejo sino también del II, pero no así el complejo III.

**Figura 14. Mecanismo postulado para la toxicidad mitocondrial mediada por dosis altas de paracetamol mediante especies reactivas de nitrógeno (RNS).**



(Barnejee et al., 2015)

También se ha sugerido que el nitrógeno reactivo podría oxidar al ubiquinol, lo que conduciría a alterar el flujo de electrones. Otro aspecto a considerar, sería la formación de S-nitrosoglutatión, el cual tiene la propiedad de inhibir al complejo I y aumentar la producción de superóxido en dicho complejo. Otras proteínas nitrosiladas son la adenin nucleótido translocasa (ANT) y el canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC-1), las cuales han sido consideradas como el principal componente del complejo poro-MPT, aún cuando no se ha determinado su importancia en nitrosilación, nitración u oxidación durante la toxicidad del paracetamol (Barnejee et al., 2015).

## **2.6 Consideraciones generales**

El paracetamol y el ibuprofeno están entre los medicamentos más utilizados, por lo que son liberados al ambiente de manera regular. Para poder evaluar el impacto al ambiente se utilizan bioindicadores como lo es el pez cebra, la rana africana, pepinos y estrellas de mar y moscas de la fruta, por citar algunos ejemplos.

En varias disciplinas biológicas se ha utilizado al pez cebra (*Danio rerio*) como un modelo para estudiar la biología del desarrollo y la genética molecular, siendo de incalculable valor en la realización de estudios toxicológicos, así como el descubrimiento de nuevos fármacos. En la Toxicología se ha empleado para evaluar la toxicidad de un fármaco, ha sido útil para identificar los puntos finales de toxicidad y la relación dosis-respuesta, elucidar los mecanismos de toxicidad y determinar la toxodinamia de un compuesto. Además de permitir hacer investigaciones detalladas a gran escala para cientos de compuestos a la vez (Hill et al., 2005). De acuerdo con las características señaladas, nuestro grupo de trabajo centro su interés en utilizar a otro miembro de la familia *Cyprinidae*, como lo es *Cyprinus carpio*, de manera puntual los embriones fertilizados.

Los experimentos fueron realizados siguiendo la guía establecida por la OECD para pruebas de toxicidad aguda (Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity, 2013)

## **2.7 Estrés oxidativo**

### **2.7.1 Estrés oxidativo y los xenobióticos**

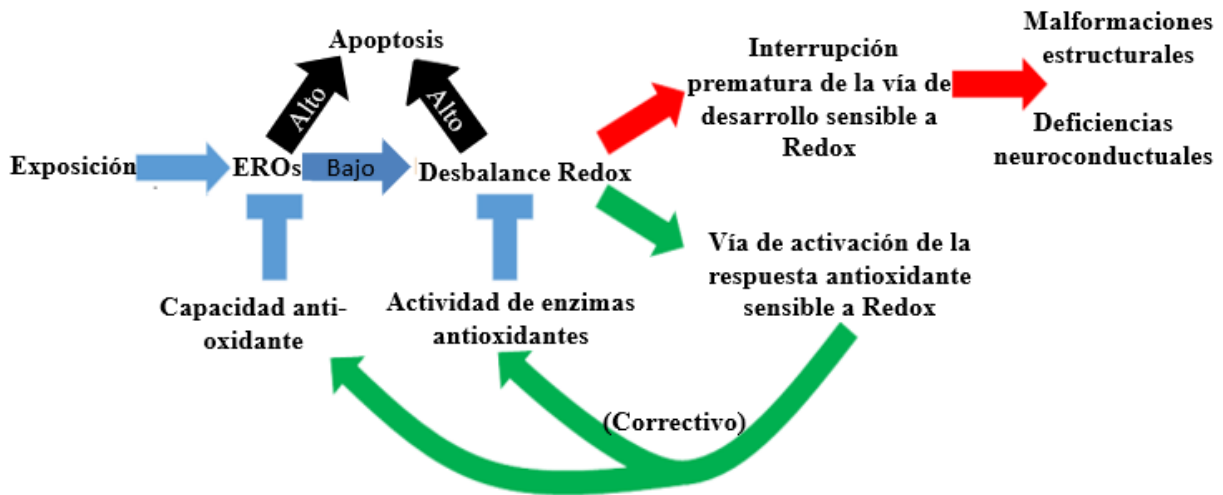
La exposición a oxidantes o xenobióticos dispara la expresión una gran variedad de genes que codifican la síntesis de proteínas antioxidantes, enzimas detoxificantes y transportadores de xenobióticos y brindar protección ante la presencia de estrés oxidativo. El estrés oxidativo, al parecer es la forma más común en que se manifiesta la toxicidad de los agentes ambientales, al través de las diversas clases de contaminantes ambientales que incluyen a los gases oxidantes, compuestos orgánicos, superficies particuladas o iones metálicos (Raghunat, et al., 2018).

### **2.7.2 Estrés oxidativo y el desarrollo**

En la presencia de un ambiente muy oxidante, las macromoléculas intracelulares son dañadas promoviendo la apoptosis o necrosis. Con niveles bajos de tóxicos de estrés oxidativo, los estados redox pueden ser desplazados y pueden causar un retraso o la interrupción de la función normal celular. Sin embargo, estas vías de señalización redox están enlazadas a sistemas que

son capaces de restaurar la funcionalidad celular redox, previo a la muerte celular. Sin embargo, hay otras vías sensibles al estado redox que están relacionadas con mecanismos involucrados en el desarrollo, que desplaza los estados redox celulares dando por resultado una señal aberrante que promueve la dismorfogénesis, Fig. 15 (Hansen et al., 2017)

**Figura 15. Panorama del estrés oxidativo sobre el desarrollo**



(Hansen et al., 2017)

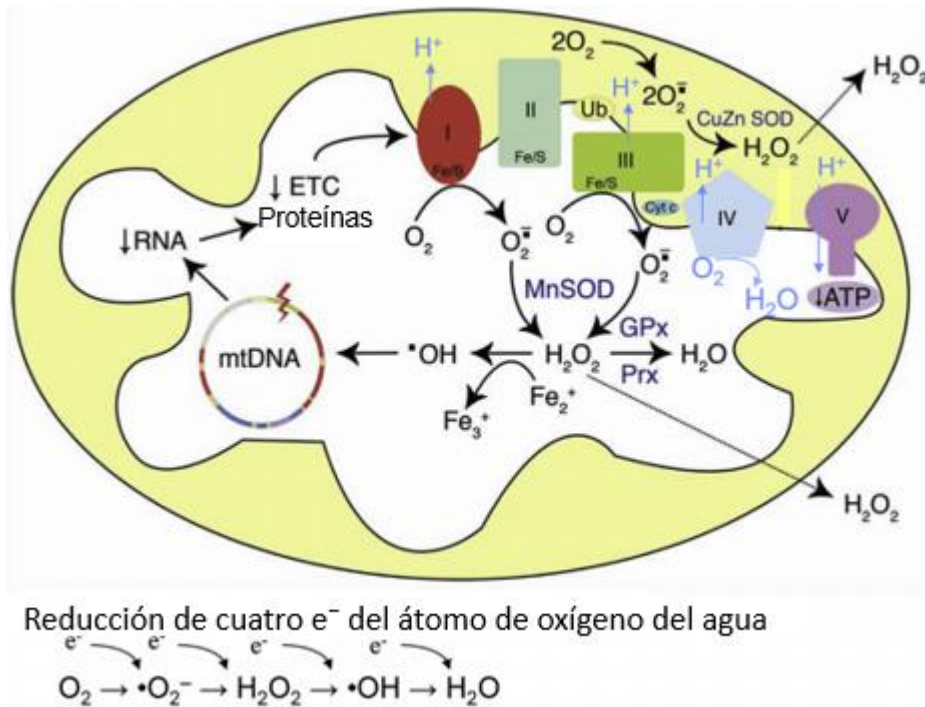
Se puede definir al desarrollo, como una mezcla de diferentes acciones celulares, tales como la diferenciación y proliferación, que ocurren de manera perfectamente coordinada, en donde la interrupción de estas acciones puede dar por resultado la afectación del mismo. Es sabido que los procesos proliferativos, de diferenciación y actividad apoptótica son regulados en alguna parte por estados redox y que cambios en éste o su desbalance los puede alterar. Se considera que los periodos más susceptibles en el desarrollo embrionario son los que definen la transición de un evento importante a otro, (por ejemplo: de la proliferación a la diferenciación) en el desarrollo de un determinado órgano o sistema. Por lo tanto, una sustancia que es capaz de inducir estrés oxidativo por largos periodos, caracterizados por desbalance redox altera el programa de desarrollo normal (Hansen et al., 2017).

### 2.7.3 Formación de las especies reactivas de oxígeno (EROs)

La reducción de un electrón en la molécula de oxígeno da por resultado la formación de EROs que incluyen el superóxido (+1e), peróxido de hidrógeno (+2e) y el radical hidroxilo (+3e), Fig. 16.



**Figura 16. Especies reactivas de oxígeno más comunes generadas en la mitocondria.**



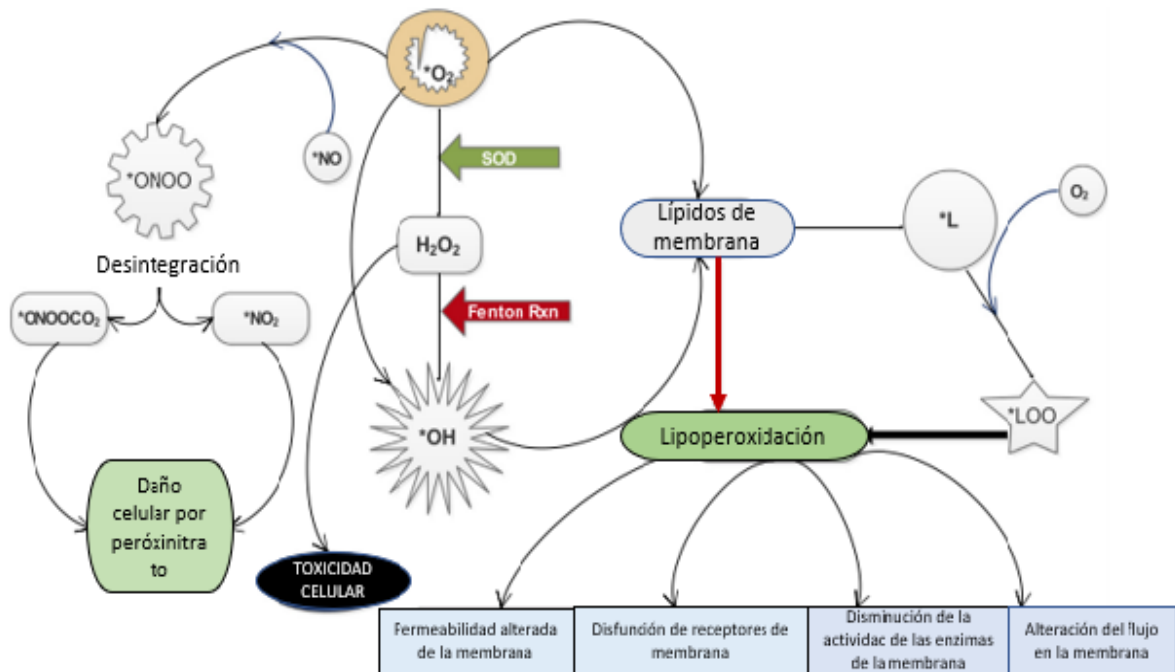
(Van Houten et al., 2017)

Las especies reactivas de oxígeno, pueden ser generadas por la lipoperoxidación (LPO), que a su vez generan un número de ácidos grasos hidroperoxidados y radicales oxi-alquil. La reacción de los radicales superóxido y óxido nítrico da por resultado un peróxinitrito, una especie nitrogenada altamente reactiva. La fuente más importante es que EROs dentro de la célula, la representa el flujo de electrones desde la cadena respiratoria mitocondrial (principalmente superóxido), el sistema P450 y sus reductasas (superóxido y peróxido de hidrógeno) y las oxidasas intracelulares, Fig. 13. Bajo determinadas condiciones pueden ser generadas oxidasas como la xantin oxidasa y convertirse en fuente de EROs. Ciertos fármacos o compuestos químicos pueden ser reducidos por P450 reductasa formando radicales inestables, los que a su vez pueden transmitir sus electrones al oxígeno molecular. Este ciclaje redox de los compuestos da por resultado la formación de grandes cantidades de superóxido intracelular (Timme- Lagary et al., 2017)

### 2.7.4 El anión superóxido y su papel en la formación de otras especies reactivas.

El anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) es generado por medio de procesos endógenos y fuentes exógenas, puede dar origen a través de diferentes cadenas de reacciones, a otras especies reactivas. De esta manera, puede formar directamente radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) o indirectamente por medio de la dismutación enzimática del peróxido de hidrógeno en una reacción Fenton en presencia de  $\text{Fe}^{+2}$ , Fig. 17. Siendo el radical hidroxilo el más peligroso de todas las especies reactivas de oxígeno y el mediador de la toxicidad celular. De forma individual, tanto el radical hidroxilo como el anión superóxido actúan sobre los lípidos de las membranas para generar el radical lipídico ( $\text{L}^\bullet$ ), que en la presencia de oxígeno forma el radical lipoperóxido ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Estos radicales actúan sobre los lípidos de la membrana produciendo un efecto oxidante devastador, promoviendo la lipoperoxidación en la membrana; comprometiendo la integridad estructural y funcional de la célula, con las siguientes características: permeabilidad de la membrana alterada, disfunción de los receptores de membrana, disminución en la actividad de las enzimas unidas a la membrana y el flujo en la misma, a consecuencia de un aumento en su rigidez (Ighodaro y Akinloge, 2018).

Figura 17. El anión superóxido en la generación de otras especies reactivas.



(Ighodaro y Akinloge, 2018)

Con lo que respecta a las proteínas, la presencia de estos radicales libres inducen uniones entrecruzadas lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína.

Otro poderoso oxidante formado por la reacción del anión superóxido y el radical óxido nítrico (\*NO) es el peróxinitrato (ONOO<sup>-</sup>), lo cual se efectúa en la presencia de arginina y una oxidasa dependiente de NADPH. Este poderoso oxidante puede causar lipoperoxidación, oxidación proteica e inactivación enzimática. Otra de sus características es que puede reaccionar con el dióxido de carbono produciendo nitroperóxycarbonato (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>) de corta duración pues se desintegra formando el radical carbonato y el radical dióxido de nitrógeno (\*NO<sub>2</sub><sup>-</sup>); los cuales han sido relacionados con la producción de daño celular (Ighodaro y Akinloge, 2018).

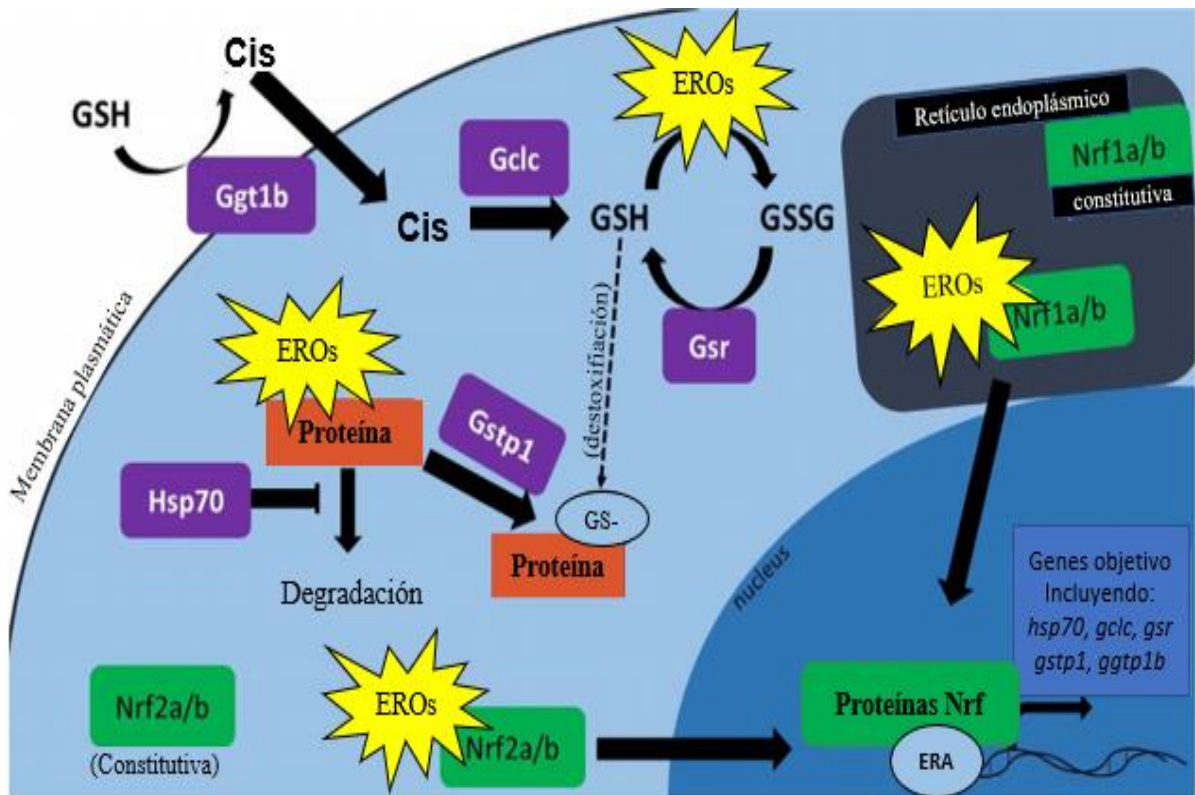
### 3.2.5 La respuesta antioxidante

La defensa anti-oxidante endógena es proporcionada por el glutatión reducido (GSH) y otros tioles como la cisteína (Cis) y tioredoxina. Estos antioxidantes desempeñan varias funciones, participando en el metabolismo de agentes potencialmente perjudiciales y restableciendo el poder reductor de la célula. La biosíntesis de muchos de los antioxidantes innatos está gobernada por la familia de factores de transcripción Cap 'n' collar, que incluyen al Factor nuclear eritroide 2 (NFE2)-factor relacionado con los factores de transcripción (Nrf). Las proteínas Nrf se unen de manera específica a secuencias de ADN, en los denominados elementos de respuesta antioxidante (ERA), que se encuentran en promotores de muchos genes quimioprotectores, los cuales están involucrados en la respuesta al estrés oxidativo. La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno puede sobrepasar la respuesta innata antioxidante, llevando a la célula a condiciones pro-oxidantes y generar lipoperoxidación, daño al ADN, interrupción de las cascadas de señalización, expresión irregular de los genes o alteración de la función proteica y degradación de las proteínas ya existentes (Timme-Lagary et al., 2012).

La señalización redox es vital para la embriogénesis. Durante el periodo de desarrollo hay cambios en el potencial redox que guían el destino celular hacia la proliferación en un estado reducido o hacia la diferenciación, apoptosis o necrosis con un incremento en el estado oxidativo, Fig.18. Muchos teratógenos desregulan el desarrollo vía estrés oxidativo y alteran la señalización redox durante la embriogénesis y la organogénesis, lo que puede provocar un decremento en el crecimiento de los tejidos y alterar su estructura y el patrón, disminuyendo el tamaño en general o incrementando la letalidad embrionaria. De esta manera, la desregulación redox puede influenciar de alguna manera la teratogénesis, haciendo más susceptible a la oxidación a GSH, Cis y la pareja Tioredoxina redox. Es así como la exposición a xenobióticos

durante el desarrollo puede modificar las diferentes parejas redox y su correspondiente vía de respuesta celular, produciendo defectos estructurales específicos (Sant et al., 2017)

**Figura 18. Las proteínas Nrf y las proteínas blanco, mantienen la señalización glutatión y redox.**

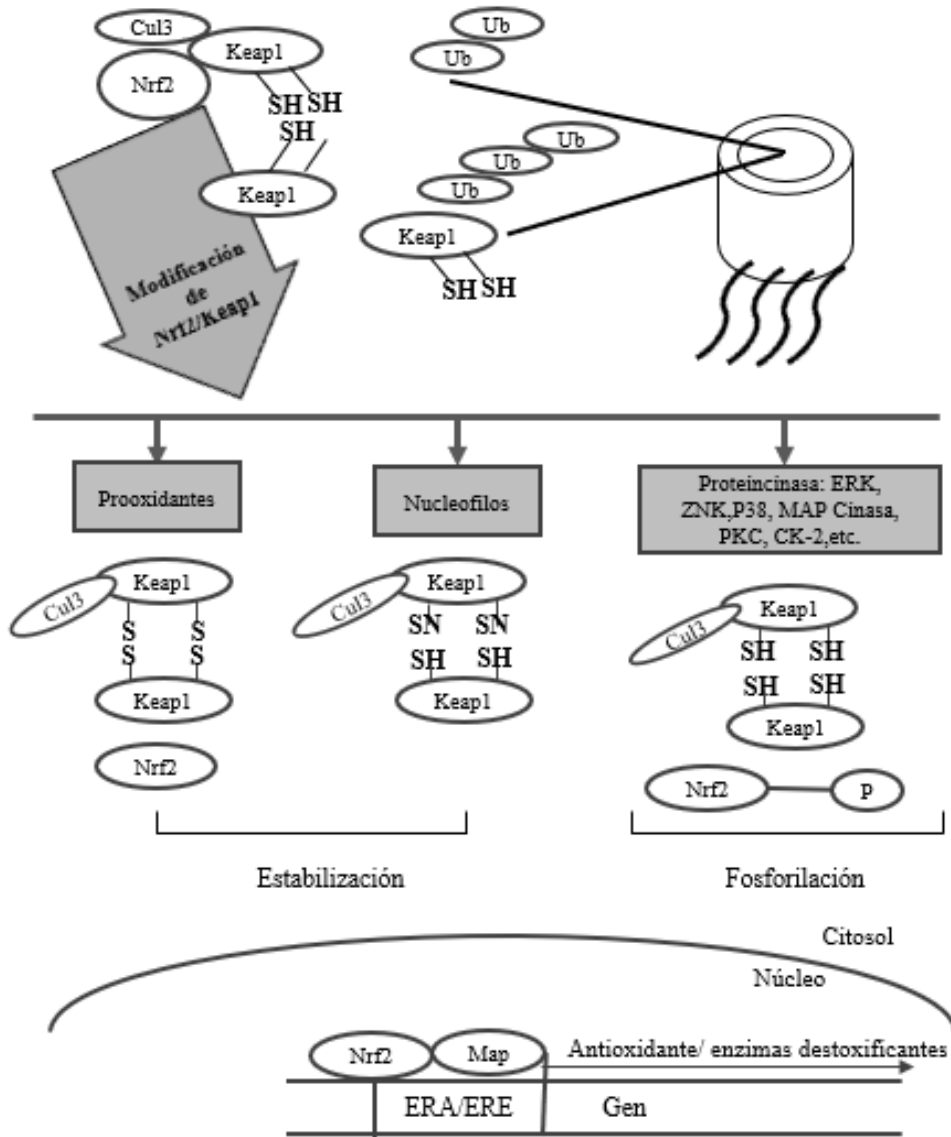


(Sant et al., 2017a)

En condiciones de baja concentración de EROs, el factor de transcripción Nrf2 se une a la proteína Keap1 formando un homodímero. El complejo proteico se une a una proteína de tamaño pequeño denominada como Cullin3 (Cul3) conduciendo a Nrf2 a su ubiquitinación seguido de la degradación proteosomal, Fig. 19. Sin embargo, durante la presencia de una agresión a través por un compuesto oxidativo o un ataque electrofílico, Nrf2 no se une a Keap1 permitiendo al primero difundir al núcleo y unirse a proteínas pequeñas del tipo Maf (sMaf), entre ellas el propio Maf y otras. Posteriormente, Nrf2 se une a los elementos de respuesta antioxidante (ERA)/(RER) regiones de elementos regulatorios localizados en genes codificantes de la respuesta antioxidante o enzimas detoxificantes de la fase 2. De esta manera, la migración de Nrf2 dentro del núcleo promueve la activación de por lo menos tres diferentes mecanismos, entre los que se pueden mencionar los siguientes: oxidación de los grupos tiol de Keap formando

disulfuros, modificación de los residuos cisteína dentro de la estructura de Keap1 mediante la presencia de electrófilos o la fosforilación del propio Nrf2 por proteincinasas que en su momento son activadas por oxidantes (Lushchak, 2014).

**Figura. 19 Función del sistema Nrf2/Keap durante la respuesta al estrés oxidativo**



(Lushchak, 2014)

## 2.8 Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo

### 2.8.1 Determinación del contenido de Hidroperóxidos

Método de Jiang et al., 1992. Naranja de metilo y oxidación ferrosa. Se tomaron 100  $\mu$ L de muestra, previamente desproteinizada con ácido tricloroacético al 10 % (ATC), se agregaron

900  $\mu$ L de la mezcla de reacción ( $\text{FeSO}_4$  0.25 mM,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 mM, naranja de xilenol 0.1 mM y 4 mM hidroxitolueno butilado en 90% (v/v) de metanol). La mezcla fue incubada durante 60 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 560 nm frente a un blanco que contuvo únicamente la mezcla de reacción. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar y se expresaron en nmol de hidróxido de cumeno/mg de proteína.

### **2.8.2 Determinación de LPX**

Método de Buege Aüst, 1978. A 100  $\mu$ L de sobrenadante se le agrega buffer TRIS-HCl pH7.4 hasta el volumen de 1 mL. Las muestras fueron incubadas a 37°C por 30 min, después agregar 2 mL del reactivo ac. tiobarbitúrico en ac. Tricloroacético al 15 % y llevar a agitación por vortex, llevar a ebullición por 45 min y enfriar, centrifugar a 3000xg por 10min. Medir la absorbancia a 535 nm contra un blanco de malondialdehido (MDA), los cálculos se realizaron utilizando el coeficiente de extinción molar de malondialdehido ( $1.56 \times 10^5$  M/cm). Los resultados se expresan en mM MDA/mg proteína.

### **2.8.3 Determinación de Proteínas Carboniladas**

Método de Levine et al. modificado, 1994. A 100  $\mu$ L de sobrenadante se le agregan 150  $\mu$ L de 10 mM DNPH en HCl 2 M, previa incubación 1 h en la oscuridad. A continuación, se adicionan 500 $\mu$ L de TCA 20% y la solución se deja reposar a 4°C por 5 min. El precipitado fue centrifugado a 11000xg por 5 min. El sedimento se lavó con etanol-etilacetato 1:1 y entonces se disolvió en 1mL una solución 6 M de guanidina a pH 2.3 e incubar a 37°C por 30 min. Se leyó la absorbancia a 366 nm. Los resultados fueron expresados nM de carbonilos reactivos (C=O) formados/mg de proteína, usando el coeficiente de extinción molar (CEM) de 21 000 M/cm.

## **2.9 Determinación de biomarcadores de efecto antioxidante**

### **2.9.1 Método para la determinación de la actividad de Catalasa**

Método de Radi et al., 1991. A 20  $\mu$ L de sobrenadante se le agregó 1 mL de un buffer constituido principalmente por peróxido de hidrógeno-sacarosa- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . La absorbancia fue a 240 nm a los 0 y 60seg. Los resultados fueron derivados por sustitución del valor de la absorbancia para cada uno de los tiempos, mediante la siguiente fórmula: Actividad de la catalasa=  $(A_0 - A_{60}) / \text{CEM}$ ; donde el CEM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tiene un valor de 0.043 nM/cm. El resultado se expresa como  $\mu$ M de  $\text{H}_2\text{O}_2$  /mg de proteína.

### **2.9.2 Método para la determinación de la actividad de Peróxido dismutasa**

Método de Mishra y Fridovich, 1972. A 40 $\mu$ L de sobrenadante se le agregaron 260  $\mu$ L de Sol Buffer de carbonato pH 10.2 y 200  $\mu$ L de adrenalina (30mM). La absorbancia fue leída a 480 nm después de 30s y 5min. La actividad enzimática fue usando el CEM de SOD de 21 M/cm y determinada interpolando en una curva tipo. El resultado fue expresado como mM SOD/mg de proteína<sup>-1</sup>.

### **2.9.3 Método para la determinación de la actividad de Glutación peroxidasa**

Método de Stephensen, et al., 2000, modificado de Gunzler y Flohe-Clairborne (1985). A 100  $\mu$ L de sobrenadante se le adicionaron 10  $\mu$ L de glutación reductasa y 290  $\mu$ L de buffer de fosfatos 7.0 y glutación reducido 3.5 mM, azida de sodio 1mM, NADPH 0.12 mM y 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.8 mM. La absorbancia fue leída a 340 nm a los 0 y 60s. La actividad enzimática fue estimada usando la siguiente ecuación: concentración de GPX= (A<sub>0</sub> – A<sub>60</sub>)/CEM, donde CEM de NADPH=6.2 mM/cm. Los resultados fueron expresados como mM NADPH/min.

## **III. JUSTIFICACIÓN**

Los fármacos se encuentran dentro de los denominados contaminantes emergentes cuya principal característica es encontrarse en cantidades que van desde los  $\mu$ g/L hasta los ng/L.

La creciente contaminación y la ineficacia de las plantas de tratamiento, ha sido tema de estudio en muchos países. En el presente proyecto de investigación tuvo como meta principal demostrar el potencial efecto tóxico debido a la presencia de los antiinflamatorios no esteroideos ibuprofeno y paracetamol, utilizando diferentes concentraciones nominales de ellos sobre la carpa común *Cyprinus carpio*.

Existen investigaciones que sustentan la existencia de cantidades importantes de fármacos en el agua y las diferentes matrices ambientales. En la actualidad, existen diferentes tipos de plantas de tratamiento de aguas residuales, sin embargo, no son lo suficientemente eficientes para eliminar todos los fármacos presentes, así que una cantidad de ellos son incorporados al agua superficial y eventualmente son consumidos por el ser humano.

En monitoreos realizados en diversos países se encontró que la cantidad de contaminantes emergentes varía de acuerdo a las variaciones de temperatura dentro de las estaciones del año.

Los xenobióticos están considerados como compuestos electrofílicos, por lo tanto, tienen propiedades oxidantes y la capacidad de inducir efectos perjudiciales sobre diferentes tipos de

organismos. Es importante conocer los efectos producidos que permitan conocer los mecanismos involucrados en los efectos perjudiciales.

#### **IV. OBJETIVOS**

##### **4.1 Objetivo general**

Evaluar la embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por ibuprofeno y paracetamol sobre la carpa común *Cyprinus carpio*.

##### **4.2 Objetivos Específicos**

Evaluar el daño al desarrollo embrionario producido por ibuprofeno y paracetamol sobre la carpa común *Cyprinus carpio*.

Determinar la concentración efectiva para las malformaciones ( $CE_{50}$ ), el índice teratogénico, así como la concentración mínima para inhibir el crecimiento y las malformaciones generales y específicas del desarrollo inducidas por exposición a ibuprofeno y paracetamol sobre la carpa común *Cyprinus carpio*.

Evaluar el estrés oxidativo inducido por ibuprofeno y paracetamol sobre ovocitos de la carpa común *Cyprinus carpio*.

Evaluar la oxidación celular inducida por ibuprofeno y paracetamol sobre ovocitos de la carpa común *Cyprinus carpio*, a través del grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos y contenido de proteínas carboniladas y la capacidad antioxidante a través de la medición de la actividad de las enzimas catalasa y peróxido dismutasa.

#### **V. MATERIALES Y MÉTODOS.**

##### **5.1 Especímenes prueba y cosecha de los ovocitos.**

Los ovocitos de *Cyprinus carpio* usados en este estudio fueron proporcionados por el Centro Acuícola de Tiacaque, ubicado en Jocotitlán, Estado de México, además de ser el principal productor de carpa común y herbívora en México. Las carpas seleccionadas para obtener los ovocitos empleados en esta investigación, fueron adultos en edad reproductiva con un tamaño de  $45 \pm 5$  cm y un peso de  $3.8 \pm 0.8$  kg. Las carpas adultas fueron colocadas en estanques semi-rústicos con agua de pozo a una temperatura entre 19 y 23°C. Fueron alimentadas con un alimento enriquecido en proteínas y carbohidratos; su dieta fue complementada con flora natural



de los estanques. En el caso de los machos, se seleccionaron los más viables para engendrar, realizando un análisis de sus características externas. Para las hembras, se tomó en cuenta las que tenían el mayor abultamiento en el vientre y con el área genital enrojecida. Una vez que fueron seleccionados los organismos apropiados, se les transfirió a los estanques para su fertilización, en donde se colocaron ocho machos por cada cuatro hembras y comenzar el cortejo. El proceso de fertilización para la obtención de los ovocitos de *C. carpio* se llevó a cabo *in situ* y por el método natural. En el caso de la carpa común, la fertilización es externa por estimulación de los machos hacia las hembras, de tal manera que mientras las hembras expulsan los huevos de forma sincronizada los machos liberan el semen dando por resultado la fertilización de dichos huevos. Una vez fertilizados, los huevos adheridos a los nidos que han sido acomodados alrededor de los estanques intencionalmente para la fertilización y reproducción, también fueron cubiertos con ramas de casuarina con el objeto de que los ovocitos sean depositados sobre ellas facilitando de esta forma su cosecha. Los ovocitos cosechados fueron clasificados mediante su observación bajo el microscopio estereoscópico y para el estudio sólo se utilizaron aquellos que se encontraban en la etapa de blástula (2 horas post-fertilización). Finalmente, una vez que los ovocitos en la etapa de blástula hubieron sido seleccionados, entonces se procedió a su exposición a las concentraciones ambientalmente relevantes (las cuales fueron encontradas en estudios de ocurrencia alrededor del mundo considerando las concentraciones en influentes y efluentes en plantas de tratamiento de aguas residuales, agua superficial, agua potable, lodos y efluentes hospitalarios) de IBU o PCM, respectivamente.

## **5.2 Sistemas de exposición**

Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo los lineamientos establecidos por la OECD en su Test No. 236 (FET, Fish Embryo Acute Toxicity, 2013). Algunas adecuaciones fueron hechas a esta guía, considerando el desarrollo para *C. carpio* y que fueron establecidas por Lujamondragón et al., (2019). Las concentraciones ambientalmente relevantes utilizadas para el estudio de embriotoxicidad y teratogenicidad en el caso del IBU fueron 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0 y 11.5 µg/L y para el PCM se utilizaron las siguientes 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, y 3.5 µg/L, estos sistemas fueron procesados de forma simultánea con un sistema control libre del fármaco correspondiente. La selección de las concentraciones fue realizada en base a estudios realizados en diferentes partes del mundo (de acuerdo a los estudios de ocurrencia mencionados en la sección de antecedentes), así como aquellos llevados a cabo en nuestro propio grupo. Los huevos

para cada uno de los sistemas fueron seleccionados al azar y colocados en placas de 24 pozos. Se colocaron 20 huevos por cada una de las concentraciones, depositando un huevo por pocillo y los sistemas fueron procesados por cinco veces en diferentes tiempos. Las placas fueron incubadas por cuatro días a  $24 \pm 1^\circ \text{C}$  con aporte de oxígeno y manteniendo dichas placas en ciclos de luz-oscuridad con intervalos de 12-12 horas, usando cámaras bioclimáticas. Con el propósito de evaluar las posibles alteraciones al desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos debido a la presencia de IBU o PCM, se realizaron observaciones a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas post-fertilización, utilizando un microscopio estereoscópico y se tomaron las fotografías correspondientes, utilizando el programa Zeiss para Windows.

Para el caso particular del IBU, las concentraciones citadas anteriormente fueron tomadas en consideración a estudios de toxicidad realizados bajo condiciones controladas, utilizando para ello bioindicadores tales como *C. carpio* y *D. magna* para evaluar estrés oxidativo (Gómez-Oliván et al., 2014c, 2014a; Heath et al., 2010; Islas-Flores et al., 2017, 2014; Kimmel et al., 1995; Kolpin et al., 2002; Metcalfe et al., 2011, 2003a; Meyer et al., 2011).

### **5.2.1 Prueba de Embrioletalidad**

Con el propósito de determinar la concentración letal 50 ( $LC_{50}$ ) y la concentración efectiva de malformaciones ( $EC_{50m}$ ), fueron utilizados los sistemas de exposición explicados en la sección 5.2. Los parámetros y la presencia de efectos teratogénicos se determinaron a las 96 hpf. Los huevos coagulados o cuando no se detectó el latido cardíaco fue el criterio para determinar letalidad. Adicionalmente, los huevos que presentaron malformaciones a las diferentes concentraciones fueron cuantificados a las 96 hpf. Con los resultados obtenidos en las cinco pruebas procesadas, fueron determinados los valores de  $LC_{50}$  y  $EC_{50m}$  por medio de una regresión lineal de probabilidad máxima en adición con su respectivo intervalo de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ). Este análisis fue realizado usando el software US-EPA versión 1.5, de acuerdo con el método recortado de Spearman-Kärber (Hamilton, et al., 1977). Los valores así obtenidos fueron utilizados para determinar el índice teratogénico (IT), el cual es definido como la relación entre  $LC_{50}/EC_{50m}$ . Para la interpretación del IT se consideraron los criterios establecidos por Weight et al., (2011). Estos consideran que si IT es mayor a 1 entonces el compuesto en estudio sería identificado como un compuesto teratogénico, pero si es menor a 1 entonces se le consideraría como un compuesto embrioletal.

### **5.2.2 Evaluación de la embriotoxicidad**

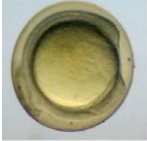
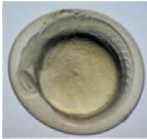
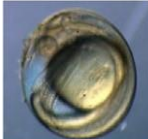
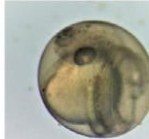


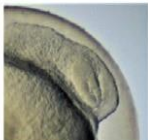




Los sistemas mencionados en la sección 5.2 fueron empleados para realizar la evaluación de los trastornos en el desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos. Para esta evaluación, los ovocitos y embriones vivos de *Cyprinus carpio* fueron observados bajo un estereomicroscopio a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf. Para este propósito se usó la puntuación establecida por Kimmel et al., (1995) y Hersem et al., (2011) con modificaciones hechas por Luja-Mondragón et al., (2019). La determinación de esta puntuación consiste en realizar una evaluación cualitativa y cuantitativa de cada embrión de *C. carpio* expuesto a IBU o PCM y siendo comparado con el embrión control, recibiendo un determinado número de puntos de acuerdo a su fase de desarrollo con respecto al tiempo de incubación, Tabla 3. El desarrollo embrionario fue evaluado considerando: 1) desarrollo de la cola, 2) formación de las somitas, 3) desarrollo del ojo, 4) movimiento, 5) circulación sanguínea, 6) latido del corazón, 7) pigmentación cabeza-cuerpo, 8) pigmentación de la cola, 9) apariencia de la aleta pectoral, 10) protuberancia bucal y 11) eclosión.

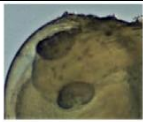
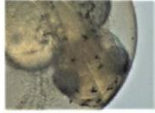


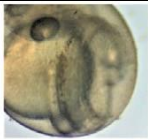




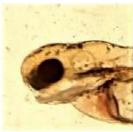



### **5.2.3 Evaluación de los efectos teratogénicos.**

De acuerdo a todos los puntos expuestos anteriormente se procedió a la evaluación que se realizó tomando la puntuación establecida por Hersem (2011) con una adaptación para el caso de la carpa común realizada por Luja-Mondragón (2019), Tabla 3.

**Tabla 3. Puntaje general de la morfología**

**General Morphology Score (GMS)**

	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
<i>Desprendimiento de cola</i>	 0				
					
	1	2	3	3 + 1 para pigmento	3 + 1 para pigmento
<i>Formación de somitas</i>	No = 0	Si = 1	Si = 1	Si = 1	Si = 1
<i>Desarrollo del ojo</i>	 1	 2	 2 + 1 para pigmento	 2 + 1 para pigmento	 2 + 1 para pigmento
<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-cuerpo</i>	0	0	  1	 1	 1
<i>Pigmentación cola</i>	0	0	 1	 1	 1
<i>Aleta pectoral</i>	0	0	0	 1	 1
				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>GMS</i>	2	7	12	16	17

Con las alteraciones el desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos identificados, se construyó un histograma de frecuencias con las principales alteraciones inducidas por la exposición a IBU o PCM sobre los ovocitos y embriones de *C. carpio*, para ello se utilizó el programa Statgraphics Centurion 18.

#### **5.2.4 Evaluación de estrés oxidativo inducido por IBU/PCM en embriones de *C. carpio***

Para evaluar la oxidación celular, se usaron los siguientes biomarcadores: contenido de hidroperóxidos (CHP), lipoperoxidación (LPX) y contenido de proteínas carboniladas (CPC), mientras que la defensa antioxidante fue evaluada por la medición de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peróxidasa (GPX). Los sistemas de exposición fueron preparados usando seis litros de agua adicionada con 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9 y 11.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de IBU (PCM: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5  $\mu\text{g/L}$ ), y un sistema control libre de IBU/PCM fue creado para cada tiempo de exposición. Un gramo de ovocitos de *C. carpio* fue adicionado a cada sistema. Los tiempos de exposición fueron 72 y 96 hpf. Posterior al periodo de exposición, el gramo de organismos es colocado en un tubo Eppendorf, al cual se le adicionó 1.5 mL de un buffer de fosfatos (PBS, pH = 7.4) procediendo a su homogenización. Las muestras fueron centrifugadas a 15 000 g X 15 minutos a 4° C. El sobrenadante fue usado para determinar CHP por el método de Jiang et al., (1992); LPX por el método de Buege y Aust, (1978); contenido de proteínas carboniladas (CPC), por el método de Levine et al., (1994); la actividad enzimática por los métodos de: Misra y Fridovich, (1972) para peróxido dismutasa (SOD); Radi et al., (1991) para catalasa (CAT) y Stephensen et al., (2000) para determinar glutatión peróxidasa. Así mismo, con el objeto de normalizar los resultados de los biomarcadores de estrés oxidativo y expresar los resultados, el contenido de proteínas totales (PT) fue determinado por el método de Bradford. Estos experimentos fueron realizados por quintuplicado.

#### **5.2.5 Análisis estadístico y criterios de validación de la prueba**

Para la dicotomía de los datos (efectos teratogénicos y de letalidad) se adecuó un modelo log-logistic. Las curvas de concentración-respuesta generadas, fueron necesarias para determinar los valores de  $EC_{50}$  (efectos teratogénicos) y  $LC_{50}$  (efectos letales). En base a estos valores fue calculado el índice teratogénico (IT) siendo definido como la relación de  $LC_{50}$  entre  $EC_{50}$  que se expresaría de la siguiente manera ( $LC_{50}/EC_{50}$ ). Estos datos fueron determinados por análisis PROBIT (EPA Analysis Program v. 1.5).

Los datos de los efectos embriotóxicos y teratógenos fueron analizados por una prueba exacta de Fisher, siendo evaluada la frecuencia de ovocitos o embriones anormales. La significancia fue aceptada cuando  $p < 0.05$ , usando el software SPSS v9 (SPSS, Chicago, IL).

Los criterios de validación utilizados en este estudio fueron principalmente dos: uno fue el rango de fertilización  $\geq 90\%$  y el segundo fue que la prueba sería considerada válida si los grupos control no muestran más del 10% de efectos teratogénicos letales a las 96hpf.

Para evaluar los resultados del ensayo de toxicidad subletal (biomarcadores de estrés oxidativo), después de la replicación de la normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza (verificada por la prueba de Shapiro-Wilk y Levene), los resultados fueron analizados por un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer con un límite de confianza del 95% para determinar diferencias significativas se usó el software SPSS v9 (SPSS, Chicago, IL).

### **5.2.6 Consideraciones éticas**

Este protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma del Estado de México, para asegurar que puede ser realizado en concordancia con los estándares institucionales para el cuidado de los animales objeto de estudio. Además, se tomaron en cuenta los lineamientos provistos por la Norma Oficial Mexicana sobre la cría, cuidado y uso de animales en el laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

## **VI. RESULTADOS**

### **6.1 Datos de Embrioletalidad y Teratogenicidad**

#### **6.1.1 Ibuprofeno**

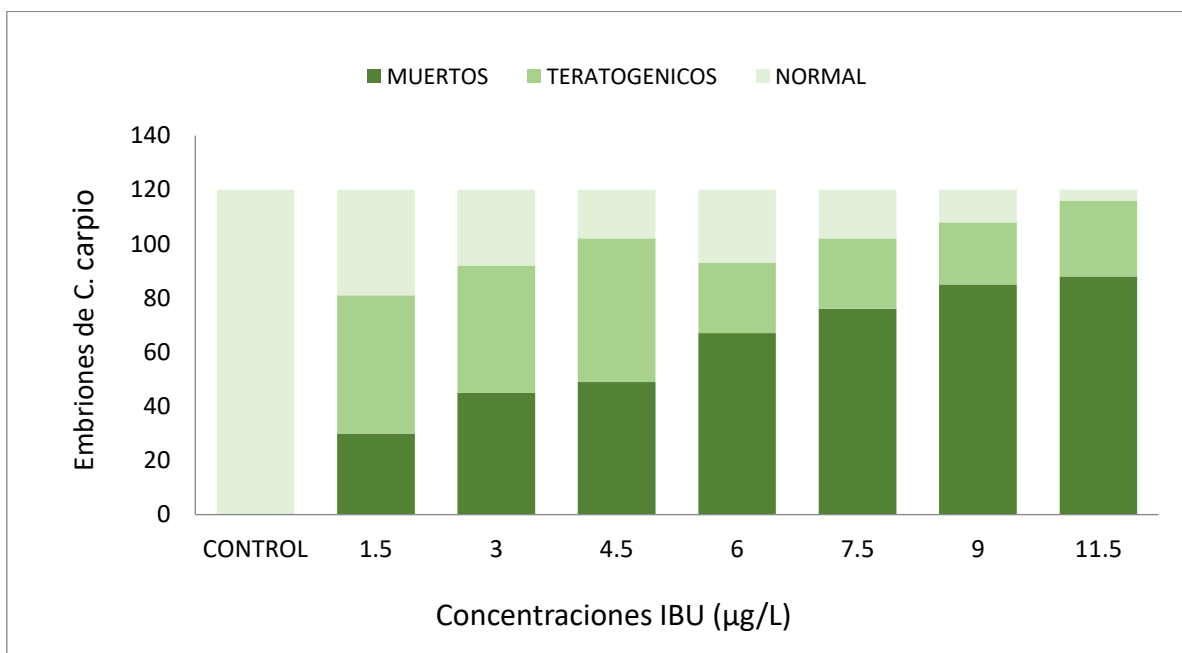
El índice de supervivencia decrece abruptamente, el rango de la mortalidad y de las malformaciones se incrementa grandemente iniciando en la concentración de 1.5  $\mu\text{g/L}$ . Estos incrementos fueron dependientes del tiempo y de la concentración (Tabla 4). Este resultado indica que los valores de  $CL_{50}$  y de  $CE_{50}$  se encuentran alrededor de 4.17  $\mu\text{g/L}$  y 1.39  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente calculado con el Software Stat graphics Centurion 18. Se encontraron 42 malformaciones en la concentración más baja de IBU y 69 en la más alta poniendo la integridad de los ovocitos y retrasando su tiempo de eclosión. La concentración más alta de IBU (11.5  $\mu\text{g/L}$ ) indujo la muerte de la mayoría de todos los embriones expuestos a las 96 h posterior a la incubación en la solución, generando el índice más alto de mortalidad (94%) y malformaciones (100%). El valor del IT para IBU fue dos veces más grande de 1 (tabla 3), esto demuestra que el IBU tiene efectos potenciales tanto tóxico sobre el desarrollo y como teratogénico durante la embriogénesis de *C. carpio*, de acuerdo a los criterios de Weight et al., (2011).

**Tabla 4. Mortalidad y malformaciones en porcentajes de acuerdo a concentraciones de IBU ambientalmente relevantes en embriones de *C. carpio*.**

IBU ( $\mu\text{g/L}$ )	Número de embriones expuestos	Mortalidad (%)	Malformaciones (%)
0	100	0	0
1.5	100	25	43
3	100	38	39
4.5	100	41	44
6	100	56	22
7.5	100	63	22
9	100	71	19
11.5	100	73	23
		LC50=4.17	EC50=1.39
		CI=  2.89-5.48	CI= 0.71-2.01
		IT=3.0	

El rango de los embriones vivos decrece significativamente (Análisis Probit,  $p \leq 0.05$ ) y la mortalidad se incrementó de acuerdo con el aumento de la concentración de IBU (Figura 20). Las malformaciones se incrementaron de forma significativa en relación al incremento de las concentraciones de IBU, no obstante, en concentraciones altas como 7.5, 9.5 y 11.5  $\mu\text{g/L}$  se observó un significativo retraso en la eclosión y muerte de los embriones.

**Figura 20. Embriones sobrevivientes, malformados y con efectos teratogénicos expuestos a las diferentes concentraciones de IBU.**





### 6.1.2 Paracetamol

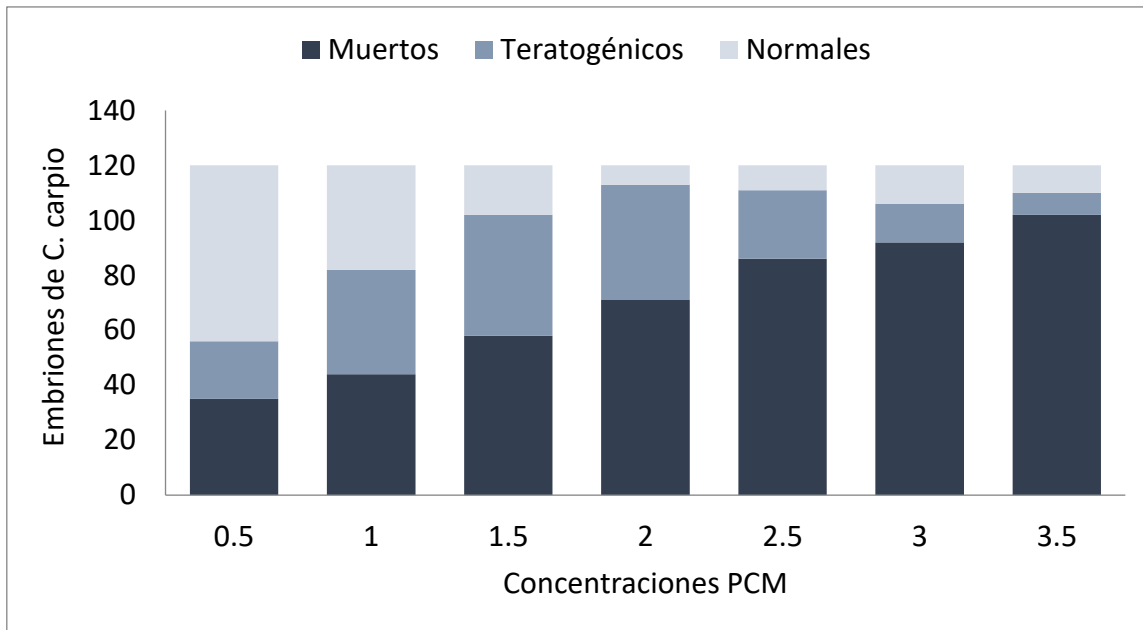
La tabla 5, muestra los resultados de los embriones muertos y malformados por haber sido expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de paracetamol usadas en este estudio. De acuerdo al aumento de la concentración, el porcentaje de mortalidad y malformaciones aumentó. El valor  $CL_{50}$  fue de 1.29 con un intervalo de confianza entre 1.13-1.44. El valor de  $CE_{50m}$  fue de 2.84 con un intervalo de confianza entre 2.38-3.65. El valor calculado para el índice teratogénico fue de 0.45. De acuerdo con los criterios establecidos por Weight et al. (2011), el paracetamol es un compuesto embrioletal.

**Tabla 5. Mortalidad y malformaciones en porcentaje de acuerdo a concentraciones de PCM ambientalmente relevantes en embriones de *C. carpio*.**

PCM ( $\mu\text{g/L}$ )	Número de embriones expuestos	Mortalidad (%)	Malformaciones (%)
0	100	0	0
0.5	100	29	18
1	100	37	32
1.5	100	48	37
2	100	59	35
2.5	100	72	21
3	100	77	12
3.5	100	85	7
		LC50=1.29	EC50=2.84
		CI= 1.13-1.44	CI= 2.38-3.65
		IT=0.45	

En la Fig. 21, se muestran los porcentajes de los embriones muertos, vivos y los que presentaron trastornos teratogénicos a las 96 hpf. Cuando la concentración de paracetamol es aumentada, se observa un decremento en el número de los embriones vivos hasta de aproximadamente un 90%. Por otro lado, el número de muertos se incrementó hasta un 75% y las alteraciones fueron disminuyendo, aunque en muchos de ellos fueron muy severas y contribuyeron de forma directa en la muerte de los embriones.

**Figura 21. Embriones sobrevivientes, malformados y con efectos teratógenicos expuestos a las diferentes concentraciones de PCM**



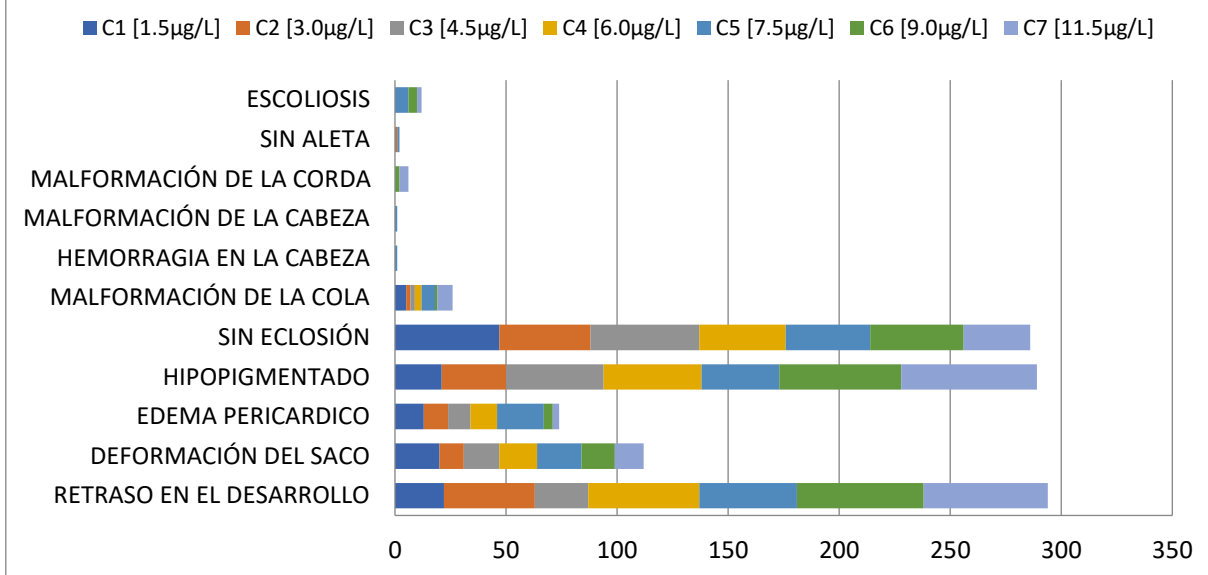
## **6.2 Principales alteraciones al desarrollo embrionario y efectos teratógenicos**

### **6.2.1 Ibuprofeno**

Varias malformaciones fueron observadas en los embriones tratados con IBU. Los trastornos más comunes observados en la Fig. 22, después de la exposición a las diferentes concentraciones de IBU fueron retraso en el proceso de eclosión, hipopigmentación, edema pericárdico, deformación del saco y retraso del desarrollo. Sin embargo, se encontraron en bajos porcentajes y concentraciones de IBU, malformaciones de la cola y escoliosis.

**Figura 22. Principales malformaciones inducidas por la exposición a concentraciones de IBU en embriones de *C. carpio*.**

## MALFORMACIONES DE IBUPROFENO



Las concentraciones más altas de IBU que corresponden a 9.0 y 11.5µg/L, mostraron aproximadamente los siguientes porcentajes: 56-57% en retraso del desarrollo, 55-61% hipopigmentación y del 30- 42% de retraso en el proceso de eclosión. En contraste, en las concentraciones más bajas de IBU (1.5 y 3.0µg/L), se observó una alta incidencia de malformaciones tales como edema pericárdico, deformación de la cola y retraso en la formación de somitas, Tabla 6.

**Tabla 6. Malformaciones totales inducidas por IBU a concentraciones ambientalmente relevantes.**

Tipos de malformaciones	Concentraciones de Ibuprofeno ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
	1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	3.0 $\mu\text{g L}^{-1}$	4.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	6.0 $\mu\text{g L}^{-1}$	7.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	9.0 $\mu\text{g L}^{-1}$	11.5 $\mu\text{g L}^{-1}$
Retraso del desarrollo	22	41	24	50	44	57	56
Deformación del saco	20	11	16	17	20	15	13
Edema pericárdico	13	11	10	12	21	4	3
Hipopigmentación	21	29	44	44	35	55	61
Retraso del proceso de eclosión	47	41	49	49	38	42	30
Malformación de la cola	5	2	2	2	6	1	7
Hemorragia de la cabeza	0	0	0	0	1	0	0
Malformación de la cabeza	0	0	0	0	1	0	0
Modificación en la estructura de la corda	0	0	0	0	0	2	4
de aleta	0	1	0	0	1	0	0
Escoliosis	0	0	0	0	6	4	2

## 6.2.2 Paracetamol

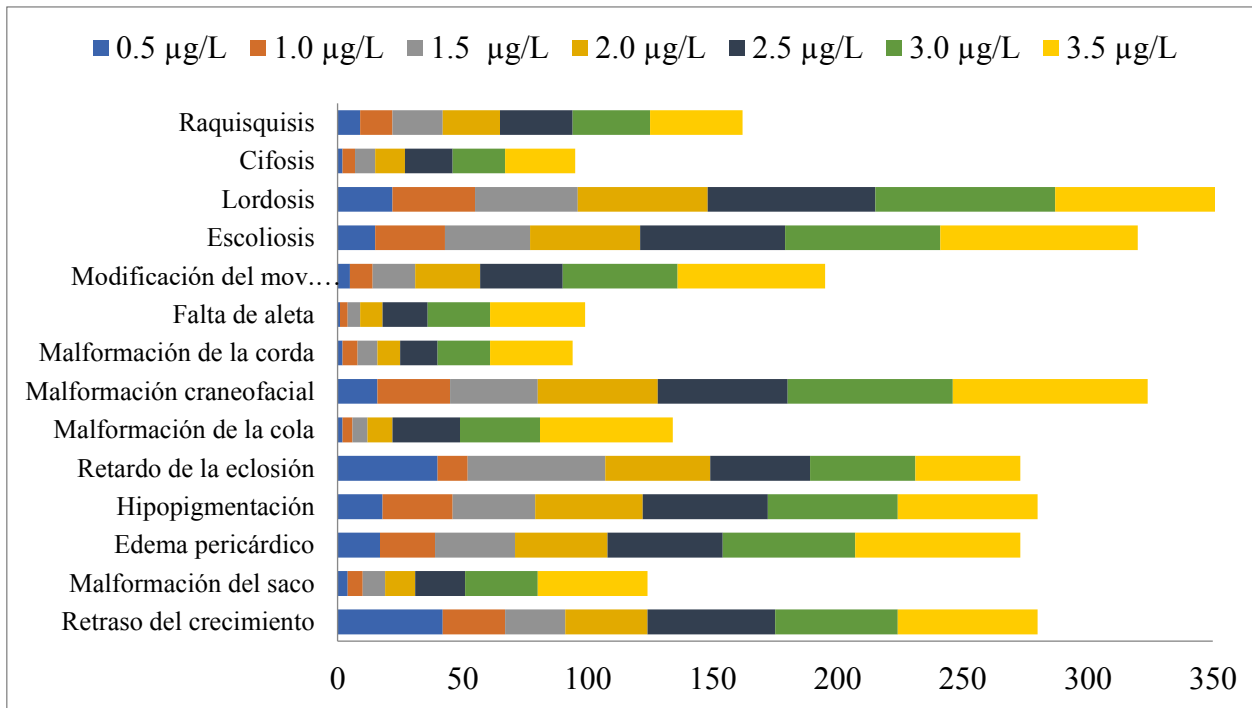
La tabla 7, muestra los porcentajes de los trastornos teratogénicos identificados en ovocitos y embriones de *C. carpio* en las diferentes concentraciones ambientalmente relevantes. Las principales alteraciones teratogénicas observadas fueron lordosis, escoliosis, malformaciones craneofaciales, hipopigmentación, retraso del crecimiento, edema pericárdico y raquisquisis

**Tabla 7. Malformaciones totales inducidas por PCM a concentraciones ambientalmente relevantes**

Malformación	Concentraciones de PCM						
	0.5 µg L <sup>-1</sup>	1.0 µg L <sup>-1</sup>	1.5 µg L <sup>-1</sup>	2.0 µg L <sup>-1</sup>	2.5 µg L <sup>-1</sup>	3.0 µg L <sup>-1</sup>	3.5 µg L <sup>-1</sup>
Retraso del crecimiento	35.00	20.80	20.00	27.50	42.50	40.80	46.70
Malformación del saco	3.33	5.00	7.50	10.00	16.70	24.20	36.70
Edema pericárdico	14.20	18.30	26.70	30.80	38.30	44.20	55.00
Hipopigmentación	15.00	23.30	27.50	35.80	41.70	43.30	46.70
Retardo de la eclosión	33.30	10.00	45.80	35.00	33.30	35.00	35.00
Malformación de la cola	1.70	3.30	5.00	8.30	22.50	26.60	44.20
Malformación craneofacial	13.30	24.20	29.20	40.00	43.30	55.00	65.00
Malformación de la corda	1.70	5.00	6.70	7.50	12.50	17.50	27.50
Sin aleta	0.80	2.50	4.20	7.50	15.00	20.80	31.70
Modificación del movimiento embionario	4.20	7.50	14.20	21.70	27.50	38.30	49.20
Escoliosis	12.50	23.30	28.30		48.30	51.70	65.80
Lordiosis	18.30	27.50	34.20	43.30	55.80	60.00	70.00
Cifosis	1.70	4.20	6.70	10.00	15.80	17.50	23.30
Raquisquisis	7.50	10.80	16.70	19.20	24.20	25.80	30.80

La Figura 23 representa los valores acumulados de las malformaciones identificadas de acuerdo a cada concentración a la que fueron expuestos. Así, en las concentraciones de 3 y 3.5µg/L se representan los trastornos más serios dando como resultado la muerte de los embriones. Las principales alteraciones que pusieron en riesgo a las larvas de *C. carpio* alteraciones craneofaciales, alteraciones en la formación de la columna vertebral y retraso de la eclosión. Muchas de estas alteraciones condujeron a la muerte del organismo.

**Figura 23. Principales malformaciones inducidas por la exposición a concentraciones de PCM en embriones de *C. carpio*.**

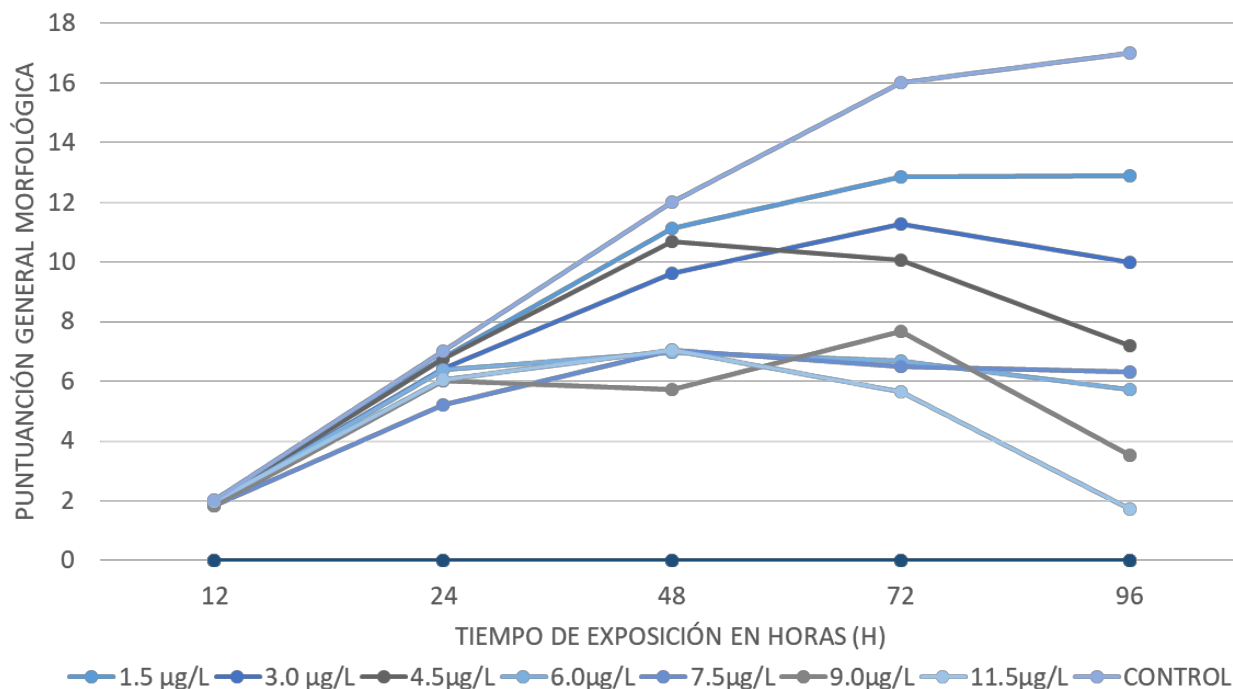


### 6.3 Puntaje del desarrollo embrionario a diferentes tiempos y concentraciones

#### 6.3.1 Ibuprofeno

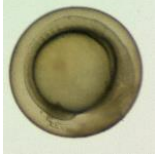

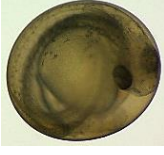


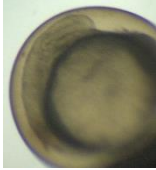

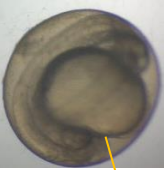
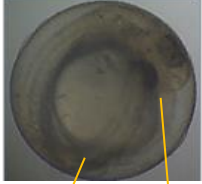

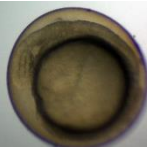
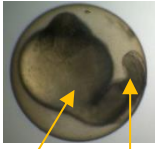
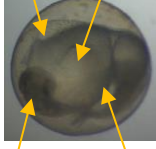
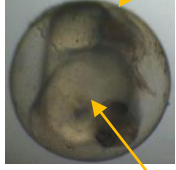

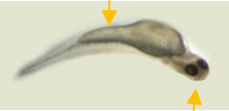
Los embriones de *C. carpio* mostraron diversas anomalías morfológicas específicas después de ser expuestos a IBU. El índice de embriones anormales (la fracción de embriones con algún efecto teratogénico) y embriones con retraso (fracción de embriones con algún retraso fueron medidos por la aplicación del puntaje tomando en consideración su morfología) se encontró que fue dependiente de la concentración de IBU en todos los tiempos. En la Fig. 24, se observó un cambio muy claro entre las curvas concentración-respuesta con respecto al control (Prueba de Fisher,  $p \leq 0.05$ ) sugiriendo que hay un efecto progresivo sobre el desarrollo en altas concentraciones de IBU. Todos los grupos de embriones expuestos a IBU decrecieron estadísticamente de forma significativa con respecto al grupo control (Prueba de Fisher,  $p \leq 0.05$ ).

**Figura 24. Curva puntuación-tiempo de exposición de IBU sobre embriones de *C. carpio*.**



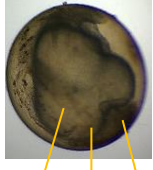

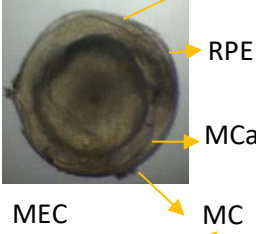
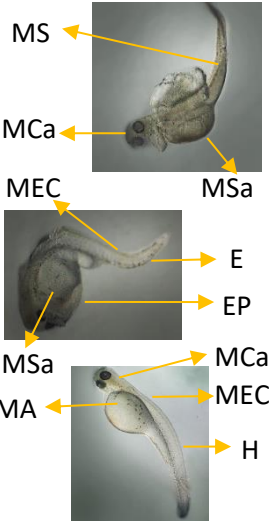
Las imágenes del control representan el desarrollo normal de los ovocitos hasta su eclosión a las diferentes horas post-fertilización (hpf). La exposición a concentraciones bajas de IBU (1.5 y 3.0 µg/L) dieron por resultado malformaciones de la cola, deformación del saco, modificación de la estructura de la corda, y edema del saco (Tabla 8). Los trastornos más comunes que se observaron en la concentración más alta (11.5 µg/L) fueron severos casos de escoliosis, alteraciones de la notocorda, edema pericárdico y malformaciones de la cola. En las concentraciones más altas de IBU y los tiempos más largos de exposición dio por resultado la aparición de malformaciones muy severas que pusieron en riesgo la vida de los embriones de carpa común, presentado un alto porcentaje de mortalidad. De esta manera, los resultados de la Tabla 8 claramente muestra como las concentraciones de IBU son capaces de generar alteraciones embrionarias y efectos teratogénicos en *C. carpio*.

**Tabla 8. Efectos de la exposición a IBU sobre las características morfológicas en embriones de *C. carpio*.**

Concentración (µg/L)	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
<b>TESTIGO</b>					
<b>1.5 µg/L</b>		 MCa	 M	 RD RPE	 MS
<b>3.0 µg/L</b>		 M MC	 ES MS MCa M	 RD RPE MS  H L	 MEC MCa

Concentración	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
4.5 µg/L		 MCS MS	 ES MSa	 L MEC MS MCS MEC MC	 MCS MC ES MS
6.0 µg/L		 MS	 ES MS	 RPE MS ES MCS MA	 MCS MES MS MA MC
7.5 µg/L	 ES	 MCS MS	 MCS M	 H RD MEC EP MCS RPE	 MEC MC MC MA MC
9.0 µg/L	 RD	 MS MCS	 ES MSa	 MCS RPE H EP MC MSa MCS RD MC	 MCS MEC MC MCS MCS MS MCS M



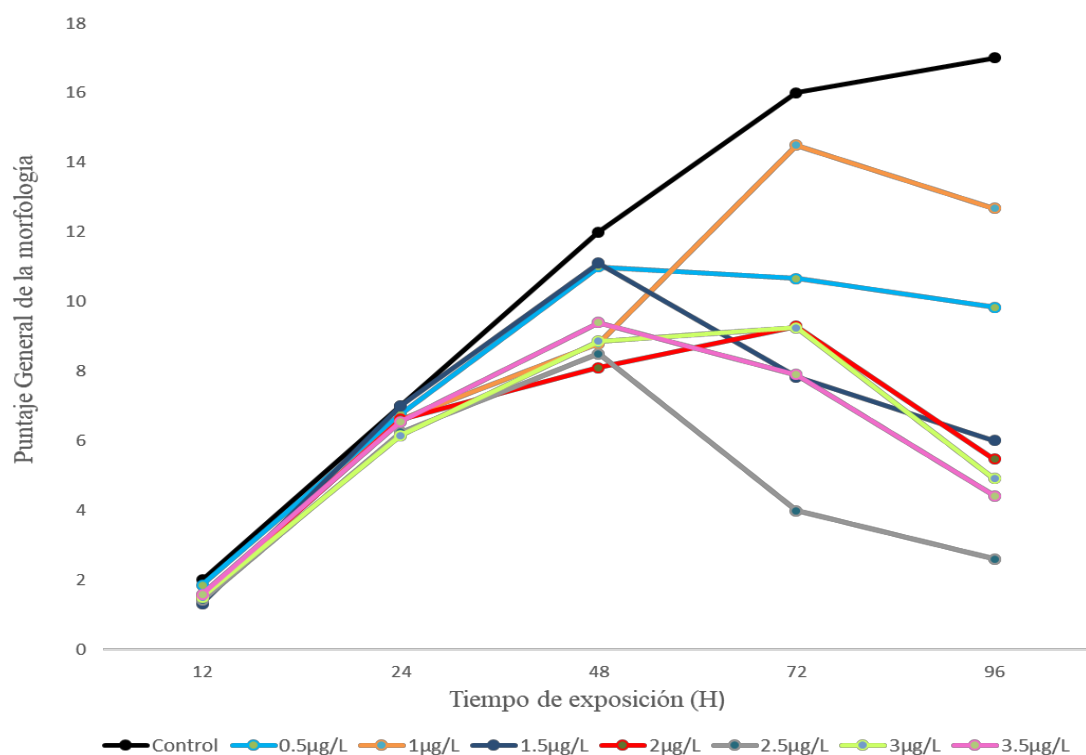
Concentración	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
11.5 µg/L		 MSa RD MCo	 MSa RD EP	 RD RPE MCo MEC MC	 MS MCo MEC MSa E EP MCo MEC MA H

NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN
<b>RPE</b>	Retraso del proceso de eclosión	<b>EP</b>	Edema Pericárdico
<b>HCo</b>	Hemorragia de la cabeza	<b>MC</b>	Malformación de la cola
<b>MEC</b>	Malformación de la estructura de la corda	<b>HS</b>	Hemorragia del saco
<b>MS</b>	Malformación severa	<b>M</b>	Misceláneo
<b>MCo</b>	Malformación del corazón	<b>HC</b>	Hemorragia de la cola
<b>MCo</b>	Malformación de la cabeza	<b>H</b>	Hipopigmentación
<b>E</b>	Escoliosis	<b>MS</b>	Malformación del saco
<b>ES</b>	Edema del saco	<b>RD</b>	Retraso del desarrollo
<b>MA</b>	Malformación de la aleta	<b>L</b>	Lordosis

### 6.3.2 Paracetamol

En la Fig.25, se muestra puntaje obtenido en cada tiempo y cada concentración para el desarrollo embrionario de los ovocitos de carpa común (*C. carpio*) en contraste con el control. Las concentraciones desde 2.5 µg/L muestran diferencias significativas en cada concentración y tiempo de exposición con respecto al control. Para las concentraciones entre 1.0 y 2.0 µg/L, se observan puntajes muy similares en el desarrollo embrionario de *C. carpio*.

**Figura 25. Curvas puntuación-tiempo de exposición a PCM sobre embriones de *C. carpio*.**



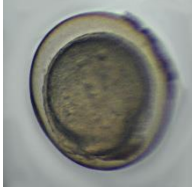
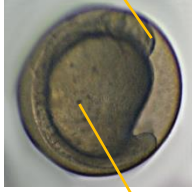
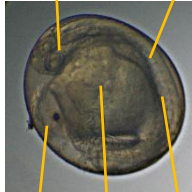
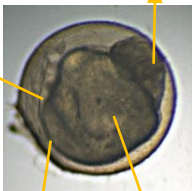
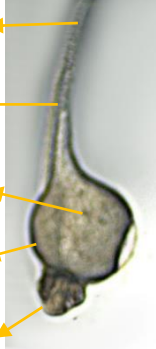


La Tabla 9, muestra las malformaciones presentadas por la exposición a las diferentes concentraciones empleadas para la prueba a los diferentes tiempos del desarrollo de los embriones hasta su eclosión. Las concentraciones desde 2.5 hasta 3.5 µg/L presentaron las malformaciones más severas. Las principales alteraciones al desarrollo presentadas en estas concentraciones fueron lordosis, escoliosis, malformaciones craneofaciales, hipopigmentación, retraso del crecimiento, edema pericárdico y raquisquisis

**Tabla 9. Efectos a la exposición de PCM sobre las características morfológicas en embriones de *C. carpio*.**

NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN
<b>MCF</b>	Malformación craneofacial	<b>EP</b>	Edema Pericárdico
<b>R</b>	Raquisquisis	<b>HCo</b>	Hemorragia de la corda
<b>L</b>	Lordosis	<b>MC</b>	Malformación de la cola
<b>MS</b>	Malformación del saco	<b>C</b>	Cifosis
<b>RE</b>	Retardo de la eclosión	<b>RD</b>	Retardo del desarrollo
<b>SA</b>	Sin aleta	<b>HC</b>	Hemorragia de la cola
<b>S</b>	Escoliosis	<b>H</b>	Hipopigmentación

	12hpf	24hpf	48hpf	72hpf	96hpf
<b>Control 0.0 µg/L</b>					
<b>0.5 µg/L</b>	 <p>MCF MC MS</p>	 <p>MCF RD MC R</p>	 <p>MCF RD MS MC</p>	 <p>MCF EP MS RE R</p>	 <p>SA L MS EP MCF</p>
<b>1.0 µg/L</b>	 <p>MCo</p>	 <p>RD MC MS MCF</p>	 <p>RD H MCF MC MS EP</p>	 <p>MCF L SA EP MS</p>	 <p>MCF MS C</p>
<b>1.5 µg/L</b>	 <p>RD</p>	 <p>MCF MS</p>	 <p>MCF MS R</p>  <p>MCF H EP MS R</p>	 <p>RD RE R MS MCF</p>	 <p>EP RE H MCF EP MS</p>  <p>L SA H</p>

	12hpf	24hpf	48hpf	72hpf	96hpf
<b>2.0 µg/L</b>					
<b>2.5 µg/L</b>					
<b>3.0 µg/L</b>					

$\mu\text{gL}^{-1}$	12hpf	24hpf	48hpf	72hpf	96hpf
3.5 $\mu\text{g/L}$	 RE	 RD MS	 EP MS H	 RE MCF H R MS  MC H MS SA MCF	 S H SA MS MCF  SA MS H C

#### 6.4 Biomarcadores de estrés oxidativo

La Tabla 10, muestra los resultados de los biomarcadores de oxidación y anti-oxidación a 72 y 96 hpf después de la exposición a las diferentes concentraciones de IBU. Como se puede ver, los valores todos los valores de los biomarcadores se incrementaron con respecto al grupo control y el tiempo de exposición de una manera estadísticamente significativa y dependiente de la concentración en los embriones de *C. carpio*. Incrementos de hasta aproximadamente el 138% fueron observados para el contenido de hidroperóxidos, 98.4% para los LPX y 256.1% para proteínas carboniladas con respecto a los grupos control ( $p \leq 0.05$ ). En el caso de la actividad antioxidante, el incremento alcanzó hasta 434.8%, 97.8% y 447.1% se observó en la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx en relación al grupo control ( $p \leq 0.05$ ). Estos incrementos fueron dependientes del tiempo y de la concentración en todos los casos.

Tabla 10 . Biomarcadores de oxidación y antioxidación celular en embriones de *C. carpio* a las 72 y 96 hpf.

Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	HPC nM of CHP mg PT <sub>-1</sub>		LPX mM MDA mg PT <sub>-1</sub>		PCC $\mu\text{M C=O mg PT}^{-1}$		SOD IU SOD mg PT <sub>-1</sub>		CAT $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$		GPX mM NADPH mg PT <sub>-1</sub>	
	72 hpf	96 hpf	72 hpf	96 hpf	72 hpf	96 hpf	72 hpf	96 hpf	72 hpf	96 hpf	72 hpf	96 hpf
Control (0)	0.60 ± 0.01	0.62 ± 0.01	65.3 ± 0.8	67.4 ± 0.8*	0.41 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.27 ± 0.3	92 ± 0.8	95 ± 1.3	0.017 ± 0.003*	0.019 ± 0.005*
1.5	0.71 ± 0.03*	0.73 ± 0.01*	71.3 ± 0.7*	74.7 ± 0.9*	0.52 ± 0.07*	0.59 ± 0.05*	0.32 ± 0.07*	0.37 ± 0.04*	102 ± 0.9*	107 ± 0.6*	0.023 ± 0.005	0.027 ± 0.006*
3.0	0.82 ± 0.02*	0.84 ± 0.02*	81.6 ± 0.7*	84.8 ± 0.6*	0.63 ± 0.02*	0.71 ± 0.03*	0.45 ± 0.05*	0.49 ± 0.03*	113 ± 1.1*	122 ± 1.7*	0.031 ± 0.007*	0.039 ± 0.005*
4.5	0.95 ± 0.03*	0.97 ± 0.02*	93.5 ± 0.5*	97.5 ± 0.8*	0.81 ± 0.05*	0.86 ± 0.07*	0.53 ± 0.04*	0.58 ± 0.05*	132 ± 0.7*	139 ± 0.5*	0.045 ± 0.005*	0.049 ± 0.003*
6.0	1.32 ± 0.04*	1.06 ± 0.05*	101.6 ± 1.4*	106.3 ± 1.6*	0.93 ± 0.07*	0.95 ± 0.05*	0.66 ± 0.05*	0.72 ± 0.05*	141 ± 1.3*	148 ± 1.7*	0.056 ± 0.004*	0.061 ± 0.007*
7.5	1.23 ± 0.03*	1.25 ± 0.06*	109.8 ± 1.2*	111.7 ± 1.5*	0.98 ± 0.08*	1.03 ± 0.06*	0.84 ± 0.07*	0.96 ± 0.05*	153 ± 0.9*	161 ± 0.5*	0.073 ± 0.005*	0.081 ± 0.004*
9.0	1.32 ± 0.03*	1.35 ± 0.05*	118.6 ± 1.3*	122.5 ± 1.1*	1.15 ± 0.07*	1.23 ± 0.05*	1.03 ± 0.05*	1.15 ± 0.07*	167 ± 0.9*	172 ± 0.6*	0.088 ± 0.005*	0.091 ± 0.004*
11.0	1.43 ± 0.02*	1.47 ± 0.04*	125.6 ± 0.7*	133.7 ± 1.1*	1.46 ± 0.05*	1.52 ± 0.07*	1.23 ± 0.06*	1.32 ± 0.05*	182 ± 0.7*	193 ± 1.1*	0.093 ± 0.003*	0.098 ± 0.005*

Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del grupo control. ANOVA y Tukey-Kramer.

CHP = Hidroperóxido de cumeno; DMA = malonaldehído; C=O= carbonilos reactivos

Los valores son el promedio de cinco réplicas ± SEM.

La Tabla 11, muestra las determinaciones de la actividad de los diferentes biomarcadores de oxidación celular y del efecto antioxidante a las 72 y 96hpf. Los resultados muestran que todos los marcadores evaluados presentan diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control ( $p < 0.05$ ) en los lapsos de tiempo evaluados. En relación a los marcadores de estrés oxidativo, éstos también mostraron un incremento estadístico de manera dependiente los intervalos de tiempo establecidos y las variaciones en la concentración ( $p < 0.05$ ). La expresión máxima de los biomarcadores mostrado entre las 72 y 96h en el status oxidativo en larvas de *C. carpio*, ocurrió a la concentración 3.5µg/L. Así, en el caso de HPC el incremento con relación al control fue de 136.2% y 80.8%, en LPX de 97.7% y 98%, para SOD de 322.2% y 341.1% y en CAT 125.3% y 114.9 ( $p < 0.05$ ). En un análisis paralelo realizado entre los diferentes sistemas, los resultados después de efectuado el tiempo de exposición en cada concentración probada, se observó que todas las concentraciones de PCM evidenciaron un conjunto de diferencias denotadas entre las 72 y 96h, a excepción de 1µg/L para la actividad de HPC y SOD; para 2µg/L en el caso de PCC y para 3µg/L para HPC ( $p < 0.05$ ). También se llevó a cabo una comparación de los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo en relación a las diferentes concentraciones de PCM ensayadas; en las cuales se observó un incremento estadístico en los diferentes biomarcadores de oxidación y anti-oxidación celular ( $p < 0.05$ ). De manera general, todos los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados se compararon de manera convincente con el tiempo de exposición y la concentración de PCM probada  $p < (0.05)$ .

**Tabla 11. Biomarcadores de oxidación y anti-oxidación celular en embriones *C. carpio* a las 72 y 96hpf, expuestos a las diferentes concentraciones de PCM.**

Concentration µg/L	HPC nM of CHP/mg PT		LPX mM MDA/mg PT		SOD IU SOD/ mg PT		CAT µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mg PT	
	72 hpf	96 hpf	72 hpf	96 hpf	72 hpf	96 hpf	72 hpf	96 hpf
	Control (0)	0.58 ± 0.01	0.63 ± 0.01	58.3 ± 0.6	61.4 ± 0.5	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.3	87 ± 1.1
0.5	0.74 ± 0.02*†‡	0.76 ± 0.02*†‡	61.2 ± 0.5*†‡	65.8 ± 0.7*†‡	0.35 ± 0.05*†‡	0.41 ± 0.06*†‡	103 ± 1.9*†‡	109 ± 1.4*†‡
1.0	0.81 ± 0.01*†‡	0.83 ± 0.03*†‡	73.6 ± 0.7*†‡	76.5 ± 0.4*†‡	0.47 ± 0.06*†‡	0.49 ± 0.05*†‡	115 ± 1.4*†‡	121 ± 1.6*†‡
1.5	0.94 ± 0.02*†‡	0.96 ± 0.02*†‡	82.6 ± 0.4*†‡	85.6 ± 0.3*†‡	0.56 ± 0.06*†‡	0.61 ± 0.04*†‡	137 ± 0.6*†‡	141 ± 0.4*†‡
2.0	1.02 ± 0.04*†‡	1.07 ± 0.05*†‡	94.6 ± 0.9*†‡	96.3 ± 0.7*†‡	0.65 ± 0.04*†‡	0.71 ± 0.04*†‡	141 ± 1.4*†‡	151 ± 1.5*†‡
2.5	1.17 ± 0.02*†‡	1.21 ± 0.03*†‡	101.8± 1.0*†‡	107.7 ± 1.2*†‡	0.85 ± 0.04*†‡	0.92 ± 0.07*†‡	157 ± 1.9*†‡	165 ± 2.5*†‡
3.0	1.29 ± 0.02*†‡	1.31 ± 0.03*†‡	108.7 ± 1.1*†‡	112.5 ± 1.0*†‡	0.98 ± 0.06*†‡	1.05 ± 0.05*†‡	171 ± 1.9*†‡	182 ± 1.6*†‡
3.5	1.37 ± 0.02*†‡	1.41 ± 0.04*†‡	115.3 ± 0.8 *†‡	121.6 ± 1.0*†‡	1.14 ± 0.04*†‡	1.28 ± 0.06*†‡	196 ± 1.6*†‡	202 ± 2.1*†‡

## VII. DICUSIÓN

El ibuprofeno es el tercero de los antiinflamatorios no esteroideos más utilizados en el mundo. El crecimiento de su consumo refleja la obicua ocurrencia de este producto farmacéutico en el ambiente acuático (Brun et al., 2006). Este medicamento ha sido detectado frecuentemente en muchos cuerpos de agua, y aguas residuales y las concentraciones en las cuales ha sido detectado se encuentran en el rango de los ng/L a µg/L (Buser et al.,1999; Tran et al., 2014). Esto representa un problema global pues el ibuprofeno tiende a acumularse y producir efectos tóxicos en diversos organismos acuáticos (Mezzelani et al., 2018).

El ibuprofeno ha sido asociado con alteración a los biomarcadores de estrés oxidativo en múltiples especies. Gonzáles-Rey y Bebianno (2011) demostraron que rompe el sistema redox de defensa y la actividad prooxidante del ibuprofeno en mejillones expuestos a concentraciones ambientales de este contaminante. Sus resultados concuerdan con los reportados por Bartoskova et al., (2013); Islas-Flores et al., (2014); Stancova et al., (2017), quienes también han demostrado que este compuesto farmacéutico induce estrés oxidativo en pez cebra, carpa común y tenca, respectivamente.

Los hallazgos encontrados cuando se trabajó con paracetamol, hacen posible determinar que a concentraciones ambientalmente relevantes es capaz de generar alteraciones al desarrollo



embrionario y efectos teratogénicos, los cuales afectan la sobrevivencia de los embriones de especies de interés económico como lo es *C. carpio*. Los efectos tóxicos del paracetamol han sido identificados en varias especies acuáticas en diferentes estudios (Choi et al., 2018; Gómez-Oliván et al., 2014c, 2012). Los principales efectos del paracetamol han sido relacionados con su habilidad a inducir estrés oxidativo en organismos acuáticos (Barbosa et al., 2020; Piedade et al., 2020; Liu et al., 2019; Nunes et al., 2017; Gómez-Oliván et al., 2014c, 2012). La capacidad del paracetamol para inducir estrés oxidativo ha sido asociada con el proceso de biotransformación, una vez que entra en este proceso genera especies reactivas de oxígeno que son capaces de oxidar biomoléculas como los lípidos y las proteínas. Es importante notar que la N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) es producida en el proceso de oxidación del paracetamol por la enzima citocromo P450, el cual es un metabolito intermedio extremadamente tóxico (Xu et al., 2008). Aunque este metabolito es muy tóxico, puede ser conjugado con el glutatión y puede ser eliminado del cuerpo (Kavitha et al., 2011). Sin embargo, concentraciones excesivas el paracetamol puede favorecer el incremento de NAPQI, generando los efectos tóxicos de este fármaco (Barbosa et al., 2020; Nunez et al., 2017).

Con el propósito de conocer la afectación sobre las primeras etapas del desarrollo, se decidió identificar las principales alteraciones al desarrollo embrionario, los efectos teratogénicos y al estrés oxidativo debido a la exposición a ibuprofeno en ovocitos y embriones de *C. carpio*, motivados por los resultados obtenidos previamente en estudios realizados en el laboratorio, en los cuales nosotros identificamos que el ibuprofeno es capaz de generar estrés oxidativo en fases juveniles de *C. carpio* en órganos como las sangre, las branquias, el hígado y el cerebro ( Islas-Flores et al., 2017, 2014). Igualmente, este medicamento ha generado la misma respuesta en otras especies acuáticas como *Daphnia magna* y *Hyaella azteca* (Gómez-Oliván., 2014ab).

De acuerdo con los resultados de la prueba de embrioletalidad, en el caso específico del paracetamol, éstos mostraron que el porcentaje de muertes y malformaciones se incrementó de manera dependiente con la concentración. Los valores medios para sobrevivencia y las malformaciones fueron aproximadamente entre 1.3 y 2.8 µg/L a las 96 h. La razón de los efectos de mortalidad observados, pueden ser explicados por la presencia de la NAPQI en el embrión. En los ciprínidos, se sabe que los hepatocitos se forman a los 32 hpf y el hígado de los embriones es funcional después de la eclosión a las 72h (Chu and Sadler, 2009; Driessen et al., 2013). Por lo tanto, las muertes observadas de los embriones son debidas al efecto tóxico de la NAPQI y está relacionada a la concentración de exposición. Adicionalmente a NAPQI las especies

reactivas de oxígeno que se forman durante la fase I de la biotransformación del paracetamol tales como el anión superóxido  $O_2^*$  y  $H_2O_2$  dado que son altamente oxidantes pueden desestabilizar las proteínas y los lípidos de las larvas de *C. carpio*, afectando sus funciones y generando la muerte de los embriones (Parolini et al., 2010; Parvez y Raisuddin, 2005). Se tiene información de que una vez que el paracetamol pasa a través del corión y se forman las especies reactivas de oxígeno dentro de la larva de *C. carpio*, estas oxidan los lípidos y se unen a las proteínas, favoreciendo la generación de efectos embriotóxicos. (Weil et al., 2009).

Diversas publicaciones científicas han reportado que los xenobióticos son compuestos capaces de dar lugar al fenómeno de estrés oxidativo, el cual ocurre cuando la relación entre las especies reactivas de oxígeno (EROs) a nivel celular exceden su eliminación de los organismos, dando por resultado un efecto perjudicial sobre los organismos, tales como oxidación de los lípidos, proteínas y ADN (Martínez-Álvarez et al., 2005). Adicionalmente, apoptosis, retraso en el desarrollo y efectos teratogénicos en diversos organismos (Pasková et al., 2011). Hay diferentes mecanismos identificados mediante los cuales el ibuprofeno puede generar estrés oxidativo. Por ejemplo, como es sabido el ibuprofeno es un derivado del ácido propiónico el cual tiene la capacidad de generar EROs en la presencia de luz (Husain et al., 2015). Asimismo, los AINEs como el ibuprofeno tienen la capacidad de desacoplar e inhibir la fosforilación oxidativa generando EROs (Will et al., 2019). Otro mecanismo sugerido a través del cual el ibuprofeno genera EROs es por la biotransformación por la CYP, produciendo 2 y 3 hidróxi derivados (Gao et al., 2018; Islas-Flores et al., 2014). En este proceso el radical anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son formadores y pueden ser responsables de generar estrés oxidativo (Doi et al., 2002). La biotransformación del ibuprofeno por CYP2C9 genera EROs dentro de las que están el radical hidroxilo ( $OH\bullet$ ) y el ión superóxido ( $O_2^- \bullet$ ) [Uno et al., 2012].

Cuando se realizó la evaluación de las malformaciones que fueron inducidas por el paracetamol a las diferentes concentraciones ambientalmente relevantes y los diferentes tiempos de exposición, nosotros observamos que las que presentaron más comúnmente fueron lordosis, escoliosis, malformaciones craneofaciales, hipopigmentación, retraso del crecimiento edema pericárdico y raquisquisis. Estas malformaciones podrían ser explicadas debido a la presencia de especies reactivas de oxígeno y de la NAPQI.

Es importante resaltar que el estrés oxidativo ha sido asociado con patologías de varias anomalías; dentro de éstas se encuentran malformaciones del esqueleto y defectos

cardiovasculares (Kovacic and Somamathan, 2014). EROs tiene un papel importante en el desarrollo embrionario, de tal manera que alteraciones en las vías de señalización transduccional se reflejará como una malformación durante el desarrollo (Dennerly, 2007; Wells et al., 2005). Ante estos hechos, nosotros fuimos capaces de corroborar en este estudio, que la exposición de embriones de *C. carpio* a concentraciones de Ibuprofeno entre 1.5 y 11.5  $\mu\text{g/L}$ , muestra alteraciones en la oxidación celular y en los biomarcadores de antioxidación, dependiente del tiempo y la concentración. Las fases tempranas del desarrollo embrionario en varios organismos acuáticos hay una alta susceptibilidad a ser dañados oxidativamente. Esto ocurre como resultado de que metabolismo aeróbico se sobrecarga debido a la alta demanda energética que ocurre en el proceso de crecimiento. Adicional a las condiciones que conducen a la alta producción de radicales libres, los altos niveles de hierro no unido a proteínas (NPBI) y la carencia en la madurez de los sistemas antioxidantes (Modh Zanuri et al., 2017; Petitjean et al., 2019)

De acuerdo con las propiedades fisicoquímicas del paracetamol que demuestran una alta solubilidad de este fármaco (0.1 mg / mL) y una alta capacidad de biotransformación (aproximadamente 90%) y a que está catalogado en base al sistema de clasificación biofarmacéutico como de clase 1. Estas características le infieren al paracetamol la capacidad para que pueda atravesar los poros del corión (0.5 – 0.7  $\mu\text{m}$ ) en los huevos fertilizados en la fase de gástrula (Rawson et al., 2000). Durante el desarrollo de los embriones la permeabilidad del corión cambia favoreciendo enormemente la penetración de acuerdo con el incremento del tiempo de desarrollo. Esto ha sido demostrado, en un estudio por Kim et al., (2004), quien identifico que es necesaria una gran fuerza de penetración para perforar el corión en las etapas de blástula y gástrula en comparación con los embriones en la etapa previa a la eclosión. Así mismo, Kais et al., (2013), demostró que la permeabilidad de 2,7-diclorofluoresceína fue mayor de acuerdo con el incremento en el tiempo del desarrollo embrionario, siendo mayor a las 48 hpf que a las 25 hpf.

Analizando los resultados obtenidos, puede verse en el estudio de embrioletalidad, a los 3  $\mu\text{g/L}$  de ibuprofeno el resultado de las muertes es de aproximadamente el 50% de larvas de *C. carpio*. Estos hallazgos podrán estar relacionados al mecanismo de acción del ibuprofeno en los mamíferos sobre la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COX1 y COX2) (Bittencourt et al., 2019) y a que han sido identificadas que tienen actividad similar en los peces (Cha et al., 2006). Es el caso particular de COX1 que está vinculada con la interrupción del crecimiento en los peces y también es importante considerar que las prostaglandinas son inhibidas por

exposición a los AINEs y que son indispensables tanto en la gastrulación como en el proceso de segmentación (Cha et al., 2006, 2005). En un estudio realizado por David and Pancharatna, (2009), se observó que el ibuprofeno a concentraciones de  $\mu\text{g/L}$  genera aproximadamente el 30% de las muertes en larvas de *Danio rerio*. Esto nos hace inferir que las larvas de *C. carpio* son más sensibles a este fármaco que el pez cebra.

Después de realizar un análisis exhaustivo de los resultados observamos que, las malformaciones craneofaciales, la lordosis, escoliosis y la raquisquisis son las más comunes, ocurriendo en todos los tiempos de exposición evaluados y en todas las concentraciones probadas. Estos resultados son consistentes con los de Cedron et al., (2020), quien demostró que el paracetamol a concentraciones de 2.5, 3.5, 4.9, 6.9, 9.6, y 13.5 mM es capaz de producir anomalías craneofaciales en una manera dosis-dependiente en pez cebra y esta droga también favorece la reducción de la expresión del gen *sox9b*. Estos autores concluyeron que el paracetamol afecta la proliferación, composición y formación conjunta de las células diferenciadas de la cresta neural craneal. Estas alteraciones craneofaciales pueden también ser atribuibles a la formación de NAPQI en el proceso de metabolización del paracetamol que es capaz de unirse a las proteínas G que están presentes en el embrión y son responsables de la regulación de la proliferación de los condriocitos, precursores del sistema esquelético (Cohen et al., 2014).

La mayoría de los efectos han sido identificados en organismos adultos en comparación con las fases iniciales de vida. Por ejemplo, la exposición de organismos adulto de *Danio rerio* a ibuprofeno en concentraciones de 1  $\mu\text{g/L}$  indujo alteraciones en la reproducción, decremento en el número de huevos engendrados, y a la exposición de 10  $\mu\text{g/L}$  también decrece el índice de eclosión de la progenie. El ibuprofeno es capaz de incrementar la mortalidad, disminuir la maduración de los espermias y la gametogénesis y producir anomalías en el desarrollo, la mayoría de las anomalías observadas por la exposición a ibuprofeno fueron: edema pericárdico y malformaciones de la espina dorsal, que también fueron ya reportadas (Ji et al., 2013).

Como se puede observar, las principales alteraciones al desarrollo embrionario identificadas en este estudio fueron el retraso en el desarrollo y retraso en el proceso de eclosión. Estas alteraciones podrían ser la consecuencia de la inhibición de enzimas importantes que participan en el proceso de eclosión como la corionasa (Haendel et al., 2004) que debido a la presencia de

EROs o por el daño oxidativo de las EROs generado sobre el corión de los ovocitos de *C. carpio*. Además, como el proceso de eclosión es un proceso se requieren grandes cantidades de oxígeno en los ovocitos, el desbalance en el estado redox ocasionado sobre los ovocitos de la carpa puede causar alteraciones en el desarrollo (Pasková et al., 2011).

Otra de las alteraciones en el desarrollo embrionario identificadas en este estudio fue la hipopigmentación, estos resultados son similares a los que fueron identificados por Cedron et al., (2020), quien detecto un decremento en la pigmentación en embriones de pez cebra expuestos a 2.5 y 6.9 mM de paracetamol y que bloquearon la síntesis de melanina. Estos mismos autores encontraron que embriones de pez cebra expuestos a 4.9  $\mu$ M de paracetamol hubo un decremento en el contenido de melanina a las 48, 72 y 96 hpf de 83.9, 65.1 y 60.3%, respectivamente. Así mismo, en otro estudio se encontró un reporte de que el paracetamol a concentraciones de  $3.3 \times 10^{-4}$  mM es capaz de reducir la pigmentación en los embriones de *Danio rerio* (David and Pancharatna, 2009). Es bien sabido que la pigmentación en los embriones de pez cebra empieza a las 25 hpf en el epitelio retinal y después a través de toda la piel (Fernández et al., 2016). En el presente estudio, la hipopigmentación de los embriones de *C. carpio* ocurrió después de las 48 hpf y después de la concentración 1.0  $\mu$ g/L. Con estos resultados se pudo concluir que al igual que en el pez cebra, el paracetamol bloquea la síntesis de melanina en los embriones de *C. carpio*. Dando continuidad a esto, como lo indicó Cedron et al., (2020), el paracetamol pudo interferir con el desarrollo de las células pigmentarias negras. También este fármaco puede actuar directamente previniendo la biotransformación de la tirosina para producir melanina (Vad et al., 2009).

Los hallazgos identificados en este estudio pueden ser confirmados con los resultados obtenidos por Flippin et al., (2007), quien demostró que la exposición a concentraciones de 1-100  $\mu$ g/L de ibuprofeno, hay decremento en el número de los eventos progenie por semana de Medaka japonesa, *Oryzias latipes*. También en los estudios llevados a cabo por Han et al., (2010) mostraron que la exposición a ibuprofeno en una concentración de 100  $\mu$ g/L causa retraso de la eclosión de los huevos de *Oryzias latipes*. En este estudio, nosotros encontramos retraso en el proceso de eclosión en la concentración más alta de ibuprofeno (11.5  $\mu$ g/L).

En el trabajo de investigación realizado con paracetamol, el edema pericárdico fue también identificado en todas las concentraciones probadas de paracetamol en *C. carpio*. Los efectos sobre el desarrollo del corazón como el edema pericárdico han sido identificados en la rana

*Xenopus laevis* expuesta a concentraciones de 100 y 150 mg/L (Fort et al., 1992). En concordancia a lo anterior, en un estudio conducido por Weight et al., (2011), se determinó que las concentraciones de 4 y 6 mM indujeron edema pericárdico en embriones de *Danio rerio*. Estas malformaciones podrían ser explicadas por el incremento de células apoptóticas observadas por Cedrón et al., (2020) en embriones de pez cebra expuestos a concentraciones de paracetamol de 2.5 y 4.9 mM a las 72 y 96 hpf. En otras publicaciones, se ha puesto de manifiesto que la apoptosis celular es responsable del daño celular y las malformaciones en las etapas tempranas de vida en los organismos acuáticos (AnvariFar et al., 2017; Elmore, 2007; Sawant et al., 2014). El retraso en el crecimiento encontrado en este estudio puede ser explicado por el incremento en el proceso de apoptosis y por el estrés oxidativo generado por las concentraciones de paracetamol en los embriones.

Los resultados son consistentes también con otros autores quienes han demostrado efectos originados por la exposición a ibuprofeno, tales como retraso en el desarrollo, anomalías cardíacas, malformaciones de la aleta pectoral, decremento en la velocidad de la eclosión, la curvatura espinal y alteraciones del comportamiento en *Danio rerio* a concentraciones mayores de 10 µg/L (David and Pancharatna, 2009).

Considerando los efectos originados por el paracetamol a concentraciones de 1 a 100 mg/L, éste ha sido asociado con retraso en el crecimiento manifestado como retraso en la eclosión, reducción en la masa corporal y deformación de la cola en embriones de pez cebra (David and Pancharatna, 2009). Estos efectos probablemente estén relacionados al mecanismo de acción del paracetamol, estudios llevados a cabo por Cha et al., (2006, 2005) mostraron que la inhibición de la ciclooxigenasa induce defectos en el sistema vascular, acortamiento de los vasos intersomáticos y causa arresto del crecimiento.

El pez cebra ha sido utilizado y analizado en la mayoría de los estudios que aseguran la capacidad embriotóxica y teratogénica del paracetamol. Sin embargo, con los hallazgos obtenidos en el estudio se demuestra que la carpa común *C. carpio* puede también ser un buen bioindicador en este tipo de pruebas y esto es de gran relevancia ya que el *C. carpio* es una especie de interés económico y ecológico en varias regiones de América Latina (Gómez-Olivan et al., 2017; Islas-Flores et al., 2017).

En estudios previos conducidos por nuestro grupo de investigación han demostrado que el ibuprofeno genera estrés oxidativo en especies centinela como *D. magna*, *H. azteca* y *C. carpio*, así como, efectos de genotoxicidad y citotoxicidad en formas juveniles de *C. carpio*.

El pez cebra ha sido utilizado y analizado en la mayoría de los estudios que aseguran la capacidad embriotóxica y teratogénica del paracetamol. Sin embargo, con los hallazgos en estos estudios demuestran que la carpa común *C. carpio* puede también ser un buen bioindicador en este tipo de pruebas y esto es de gran relevancia ya que el *C. carpio* es una especie de interés económico y ecológico en varias regiones de América Latina (Gómez-Olivan et al., 2017; Islas-Flores et al., 2017).

De todo lo expresado anteriormente se puede inferir que los resultados proporcionados en este trabajo de investigación, nos permitieron identificar que el ibuprofeno es capaz de generar alteraciones en el desarrollo embrionario y efectos teratogénicos en embriones de *C. carpio*, además, inducir estrés oxidativo. Finalmente, los resultados permiten considerar al ibuprofeno como una sustancia peligrosa para la carpa común en concentraciones muy bajas

Con lo que respecta al paracetamol, se puede concluir que este fármaco actúa a diferentes niveles, uno de ellos es alterando la permeabilidad del corión y las especies reactivas que son formadas en su biotransformación incluyendo a la NAPQI tienen la capacidad de modificar las funciones de biomoléculas en los embriones de la carpa común *Cyprinus carpio*.

Por último, se puede considerar a *Cyprinus carpio* como un excelente modelo biológico y un buen indicador de contaminación provocada por los antiinflamatorios no esteroideos.

## **VIII. CONCLUSIONES**

Se pudo demostrar que el ibuprofeno a concentraciones comprendidas entre 1.5 y 11.5 µg/L. Es capaz de inducir alteraciones al desarrollo embrionario y efectos teratogénicos en ovocitos y embriones de la carpa común *C. carpio*. Esta observación también hecha con la exposición a las concentraciones seleccionadas para el paracetamol. La diferencia en los valores obtenidos de IT para los dos fármacos, sería una forma de confirmar todo lo explicado a cerca de sus mecanismos de acción. Así, un valor de 3.0 para IT, hace reflexionar sobre el mecanismo de inversión quiral metabólica que se presenta. El paracetamol dio por resultado un índice teratogénico de 0.45. Cabe recordar que este fármaco tiene acción principalmente sobre sistema nervioso central y

actúa de una manera muy sensible sobre la isoforma de las ciclooxigenasas COX3, de allí que las malformaciones observadas sean las malformaciones craneofaciales. Las malformaciones más comunes sobre en el desarrollo embrionario generadas por el ibuprofeno fueron retraso en el proceso de la eclosión, hipopigmentación, edema pericárdico, malformaciones del saco y retraso en el desarrollo.

En el caso del paracetamol, la supervivencia al 50% de los embriones fue a la concentración de 1.29 µg/L. La concentración efectiva para malformaciones fue a 2.84 µg/L. De acuerdo con los criterios establecidos por Weight et al., (2011), este fármaco es embrioletal. En las concentraciones entre 2.0 y 3.5 µg/L, se manifestaron las malformaciones más severas. Las alteraciones al desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos presentados contribuyeron a la muerte de aproximadamente el 70% de los embriones en la concentración más alta probada. A concentraciones muy bajas, tanto el ibuprofeno como el paracetamol son capaces de alterar el desarrollo embrionario de especies de interés económico y ecológico como lo es *Cyprinus carpio*.

## **IX. PERSPECTIVAS**

Envidentemente, el estudio del impacto de los contaminantes emergentes o micro-contaminantes sobre las especies de interés comercial pone de manifiesto la importancia de realizar investigaciones que expongan los daños en su desarrollo, crecimiento y supervivencia.

Esto abre la posibilidad de continuar realizando estudios sobre los efectos de muchos otros micro-contaminantes sobre organismos no sólo acuáticos sino también terrestres e incluso sobre plantas de interés agrícola y comercial.

Otra aplicación de este tipo de estudios es conocer de manera precisa los mecanismos involucrados en la señalización celular que marcan los cambios durante el crecimiento y desarrollo y poder identificar las moléculas afectadas y predecir los efectos finales de los mismo sobre un organismo.

Este tipo de investigaciones, también están permitiendo plantear estudios sobre lo que es llamado la bioremedación, es decir no sólo como los micro-contaminantes están afectando el ambiente, si no también cómo algunos organismos han logrado sobrevivir a esta agresión al ambiente y utilizar los mecanismos moleculares que les han permitido sobrevivir y utilizarlos para eliminar los efectos deletéreos causados.



En otro aspecto, estos modelos biológicos han tomado gran importancia, debido al cambio en las consideraciones éticas involucradas en el trabajo de investigación que utiliza animales vivos en el desarrollo de la misma. Muchas instituciones, actualmente han restringido y hasta prohibido el uso de animales como los ratones, cobayos, ratas, etc. Cobrando relevancia el uso de ovocitos de moscas, peces, etc.

Estos modelos están siendo utilizados en el estudio de los mecanismos involucrados en la biología molecular del cáncer con el propósito de determinar las moléculas maestras que causan los cambios en la señalización celular y que conduce a la multiplicación celular descontrolada.

## **BIBLIOGRAFIA**

Acetaminophen Global Market Report 2018, 2018. 2018 2023 Global Acetaminophen Consumption Market – Industry Reports [WWW Document]. URL <https://www.360researchreports.com/2018-2023-global-acetaminophen-consumption-market-12641200> (accessed 3.25.20).

Acevedo-Barrios, R.L., Severiche-Sierra, C.A., Jaimes Morales, J.D.C., 2017. Efectos tóxicos del paracetamol en la salud humana y el ambiente. *Rev. Investig. Agrar. y Ambient.* 8, 139–149. <https://doi.org/10.22490/21456453.1845>

Anderson, B.J., 2008. Paracetamol (Acetaminophen): Mechanisms of action. *Paediatr. Anaesth.* <https://doi.org/10.1111/j.1460-9592.2008.02764.x>

AnvariFar, H., Amirkolaie, A.K., Miandare, H.K., Ouraji, H., Jalali, M.A., Üçüncü, S.İ., 2017. Apoptosis in fish: environmental factors and programmed cell death. *Cell Tissue Res.* <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2548-x>

Archer, E., Petrie, B., Kasprzyk-Hordern, B., Wolfaardt, G.M., 2017. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. *Chemosphere* 174, 437–446. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.01.101>

Balbi, T., Auguste, M., Cortese, K., Montagna, M., Borello, A., Pruzzo, C., Vezzulli, L., Canesi, L.,

2019. Responses of *Mytilus galloprovincialis* to challenge with the emerging marine pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 84, 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.011>
- Barbosa, I., Pizarro, I., Freitas, R., Nunes, B., 2020. Antioxidative and neurotoxicity effects of acute and chronic exposure of the estuarine polychaete *Hediste diversicolor* to paracetamol. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 77, 103377. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103377>
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.E., Park, H.S., 2011. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci. Total Environ.* 409, 4351–4360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.015>
- Bittencourt, J.A.H.M., Neto, M.F.A., Lacerda, P.S., Bittencourt, R.C.V.S., Silva, R.C., Lobato, C.C., Silva, L.B., Leite, F.H.A., Zuliani, J.P., Rosa, J.M.C., Borges, R.S., Santos, C.B.R., 2019. In Silico Evaluation of Ibuprofen and Two Benzoylpropionic Acid Derivatives with Potential Anti-Inflammatory Activity. *Molecules* (Basel, Switzerland) 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24081476>
- Botting, R., Ayoub, S.S., 2005. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen, in: *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. Churchill Livingstone, pp. 85–87. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2004.10.005>
- Bottoni, P., Caroli, S., 2018. Presence of residues and metabolites of pharmaceuticals in environmental compartments, food commodities and workplaces: A review spanning the three-year period 2014–2016. *Microchem. J.* 136, 2–24. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.06.016>
- Bound, J.P., Voulvoulis, N., 2006. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Res.* 40, 2885–2892. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.036>
- Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D., 1999. Occurrence and environmental behavior of the chiral

- pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2529–2535. <https://doi.org/10.1021/es981014w>
- Cantwell, M.G., Katz, D.R., Sullivan, J.C., Lyman, M., 2019. Evaluation of wastewater tracers to predict pharmaceutical distributions and behavior in the Long Island Sound estuary. *Chemosphere* 220, 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.171>
- Cedron, V.P., Weiner, A.M.J., Vera, M., Sanchez, L., 2020. Acetaminophen affects the survivor, pigmentation and development of craniofacial structures in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biochem. Pharmacol.* 174, 113816. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113816>
- Cha, Y.I., Kim, S.-H., Solnica-Krezel, L., DuBois, R.N., 2005. Cyclooxygenase-1 signaling is required for vascular tube formation during development. *Dev. Biol.* 282, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.014>
- Cha, Y.I., Solnica-Krezel, L., DuBois, R.N., 2006. Fishing for prostanoids: Deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Dev. Biol.* 289, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.10.013>
- Choi, E., Alsop, D., Wilson, J.Y., 2018. The effects of chronic acetaminophen exposure on the kidney, gill and liver in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 198, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.007>
- Chu, J., Sadler, K.C., 2009. New school in liver development: Lessons from zebrafish. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.23157>
- Cohen, S.P., LaChappelle, A.R., Walker, B.S., Lassiter, C.S., 2014. Modulation of estrogen causes disruption of craniofacial chondrogenesis in *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 152, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.028>
- Combelles, C.M.H., Gupta, S., Agarwal, A., 2009. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reproductive biomedicine online* 18, 864–80

- Daneshvar, A., Svanfelt, J., Kronberg, L., Weyhenmeyer, G.A., 2012. Neglected sources of pharmaceuticals in river water--footprints of a Reggae festival. *Journal of environmental monitoring* : JEM 14, 596–603. <https://doi.org/10.1039/c1em10551e>
- David, A., Pancharatna, K., 2009. Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 27, 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.01.002>
- David, A., Pancharatna, K., 2009. Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *J. Appl. Toxicol.* 29, 597–602. <https://doi.org/10.1002/jat.1446>
- Delaney, J.A.C., Biggs, M.L., Kronmal, R.A., Psaty, B.M., 2011. Demographic, medical, and behavioral characteristics associated with over the counter non-steroidal anti-inflammatory drug use in a population-based cohort: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 20, 83–89. <https://doi.org/10.1002/pds.2065>
- De Luna, M.D.G., Veciana, M.L., Su, C.C., Lu, M.C., 2012. Acetaminophen degradation by electro-Fenton and photoelectro-Fenton using a double cathode electrochemical cell. *J. Hazard. Mater.* 217–218, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.018>
- Doi, H., Iwasaki, H., Masubuchi, Y., Nishigaki, R., Horie, T., 2002. Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chemico-biological interactions* 140, 109–119. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(02\)00004-2](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(02)00004-2)
- Driessen, M., Kienhuis, A.S., Pennings, J.L.A., Pronk, T.E., Van De Brandhof, E.J., Roodbergen, M., Spaik, H.P., Van De Water, B., Van Der Ven, L.T.M., 2013. Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling. *Arch. Toxicol.* 87, 807–823. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1039-z>
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.*

<https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

- Eslami, A., Amini, M.M., Yazdanbakhsh, A.R., Rastkari, N., Mohseni-Bandpei, A., Nasseri, S., Piroti, E., Asadi, A., 2015. Occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Tehran source water, municipal and hospital wastewaters, and their ecotoxicological risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment* 187, 734. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4952-1>
- Fernandes, B., Matamá, T., Guimarães, D., Gomes, A., Cavaco-Paulo, A., 2016. Fluorescent quantification of melanin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 29, 707–712. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12535>
- Flippin, J.L., Huggett, D., Foran, C.M., 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology* 81, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.002>
- Fort, D.J., Rayburn, J.R., Bantle, J.A., 1992. Evaluation of acetaminophen-induced developmental toxicity using FETAX. *Drug Chem. Toxicol.* 15, 329–350. <https://doi.org/10.3109/01480549209014161>
- Gao, X., Geng, J., Du, Y., Li, S., Wu, G., Fu, Y., Ren, H., 2018. Comparative study of the toxicity between three non-steroidal anti-inflammatory drugs and their UV/Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> degradation products on *Cyprinus carpio*. *Scientific Reports* 8, 13512. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29524-1>
- Gómez-Oliván, L.M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Dublán-García, O., Corral-Avitia, A.Y., 2012. Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyalella azteca*. *Water, Air, Soil Pollut.* 223, 5097–5104. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1261-y>
- Gómez-Oliván, L.M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., 2014. Binary mixtures of diclofenac with paracetamol, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid and these pharmaceuticals in isolated form induce oxidative stress on *Hyalella azteca*. *Environ. Monit.*

Assess. 186, 7259–7271. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3925-0>

- Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N., 2014a. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chem. Toxicol.* 37, 391–399. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.870191>
- Gómez-Oliván, L.M., Mendoza-Zenil, Y.P., SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., Ramírez-Durán, N., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. del C., Rodríguez-Fariñas, N., Islas-Flores, H., Elizalde-Velázquez, A., García-Medina, S., Pérez-Pastén Borja, R., 2017. Geno- and cytotoxicity induced on *Cyprinus carpio* by aluminum, iron, mercury and mixture thereof. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 135, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.037>
- Guerra, P., Kim, M., Shah, A., Alae, M., Smyth, S.A., 2014. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* 473–474, 235–243. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.12.008>
- Gutiérrez-Noya, V.M., Gómez-Oliván, L.M., Ramírez-Montero, M. del C., Islas-Flores, H., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Romero, R., 2020. Ibuprofen at environmentally relevant concentrations alters embryonic development, induces teratogenesis and oxidative stress in *Cyprinus carpio*. *Sci. Total Environ.* 710, 136327. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136327>
- Haendel, M.A., Tilton, F., Bailey, G.S., Tanguay, R.L., 2004. Developmental Toxicity of the Dithiocarbamate Pesticide Sodium Metam in Zebrafish. *Toxicological Sciences* 81, 390–400. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh202>
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R. V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714–719. <https://doi.org/10.1021/es60130a004>
- Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, K., Khim, J.S., Zhang, X., Giesy, J.P.,

2010. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Toxicology* 98, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.013>
- Hans-Rudolf Buser, \*, Thomas Poiger, and Müller, M.D., 1999. Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. <https://doi.org/10.1021/ES981014W>
- Heath, E., Kosjek, T., Farre, M., Quintana, J.B., de Alencastro, L.F., Castiglioni, S., Gans, O., Langford, K., Loos, R., Radjenović, J., Rocca, L.M., Budzinski, H., Tsipi, D., Petrovic, M., Barcelo, D., 2010. Second interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drug analysis in environmental aqueous samples. *Talanta* 81, 1189–1196. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2010.02.009>
- Hermesen, S.A.B., van den Brandhof, E.-J., van der Ven, L.T.M., Piersma, A.H., 2011. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicol. Vitro* 25, 745–753. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.005>
- Hersh, E. V., Lally, E.T., Moore, P.A., 2005. Update on cyclooxygenase inhibitors: Has a third COX isoform entered the fray?, in: *Current Medical Research and Opinion*. pp. 1217–1226. <https://doi.org/10.1185/030079905X56367>
- Hao, H., Wang, G., Son, J. 2005. Enantioselective Pharmacokinetics of Ibuprofen and Involved Mechanisms. *Drug Metabolism Reviews*, 1:215-234. Doi:10.1081/DMR-200047999
- Högestatt, E.D., Jönsson, B.A.G., Ermund, A., Andersson, D.A., Henrik Björk, H., Alexander, J.P., Cravatt, B. F., Basbaum, A. I. and Zygmunt, P. M., 2005. Conversion of Acetaminophen to the Bioactive N-Acylphenolamine AM404 via Fatty Acid Amide Hydrolase-dependent Arachidonic Acid Conjugation in the Nervous System. *The journal of biological chemistry*. 280 (36): 31405–31412
- Husain, M.A., Sarwar, T., Rehman, S.U., Ishqi, H.M., Tabish, M., 2015. Ibuprofen causes photocleavage

through ROS generation and intercalates with DNA: a combined biophysical and molecular docking approach. *Physical chemistry chemical physics: PCCP* 17, 13837–50. <https://doi.org/10.1039/c5cp00272a>

Inotai, A., Hankó, B., Mészáros, Á., 2010. Trends in the non-steroidal anti-inflammatory drug market in six Central-Eastern European countries based on retail information. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 19, 183–190. <https://doi.org/10.1002/pds.1893>

Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Neri-Cruz, N., Dublán-García, O., 2014a. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 5157–5166. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2477-0>

Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Neri-Cruz, N., Dublán-García, O., 2014b. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 5157–5166. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2477-0>

Islas-Flores, H., Manuel Gómez-Oliván, L., Galar-Martínez, M., Michelle Sánchez-Ocampo, E., SanJuan-Reyes, N., Ortíz-Reynoso, M., Dublán-García, O., 2017. Cyto-genotoxicity and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to a mixture of ibuprofen and diclofenac. *Environ. Toxicol.* 32, 1637–1650. <https://doi.org/10.1002/tox.22392>

Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C.S., Ternes, T.A., Thomsen, A., Siegrist, H., 2006. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Res.* 40, 1686–1696. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.02.014>

Kai, K., Ikeda, S. and Muto, M., 2013. The Difference in Analgesic Use of Acetaminophen between in Japan and Other Countries, and Possible Drug Cost Reduction Caused by the Acetaminophen Prevalence in Japan. *Japanese Journal of Pharmacoepidemiology* 17(2):75-86.



<https://doi.org/10.3820/jjpe.17.75>

- Kais, B., Schneider, K.E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T., 2013. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-Implications for the fish embryo test (FET). *Aquat. Toxicol.* 140–141, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.022>
- Kane SP, n.d. Ibuprofen, ClinCalc DrugStats Database, Version 19.1. [WWW Document]. Updated November 24, 2018. URL clincalc: <https://clincalc.com/DrugStats/Drugs/Ibuprofen>. (accessed 8.20.19).
- Katzung, B.G., Trevor, A.J., *Farmacología Básica y Clínica*, 13<sup>a</sup> edición, 2016. McGrawhill-Lange, 2016. 315,634. ISBN: 978-607-15-1367-0
- Kavitha, P., Ramesh, R., Bupesh, G., Stalin, A., Subramanian, P., 2011. Hepatoprotective activity of *Tribulus terrestris* extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*). *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 47, 698–706. <https://doi.org/10.1007/s11626-011-9457-9>
- Kawabata, K., Sugihara, K., Sanoh, S., Kitamura, S., Ohta, S., 2012. Ultraviolet-photoproduct of acetaminophen: Structure determination and evaluation of ecotoxicological effect. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 249, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.07.018>
- Kim, D.H., Sun, Y., Yun, S., Kim, B., Hwang, C.N., Lee, S.H., Nelson, B.J., 2004. Mechanical property characterization of the zebrafish embryo chorion, in: *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology - Proceedings*. pp. 5061–5064. <https://doi.org/10.1109/iembs.2004.1404399>
- Kim, J.-W., Jang, H.-S., Kim, J.-G., Ishibashi, H., Hirano, M., Nasu, K., Ichikawa, N., Takao, Y., Shinohara, R., Arizono, K., 2009. Occurrence of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in Surface Water from Mankyung River, South Korea. *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE* 55, 249–258. <https://doi.org/10.1248/jhs.55.249>

- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
- Klinger-Gratz, P.P., Ralvenius, W.T., Neumann, E., Kato, A., Nyilas, R., Lele, Z., Katona, I., Zeilhofer, H.U., 2018. Acetaminophen Relieves Inflammatory Pain through CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors in the Rostal Vntromedial Medulla. *The Journal of Neuroscience* 38(2): 322-334. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.1945-17.2017.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental science & technology* 36, 1202–11.
- Kovacic, P., Somanathan, R., 2014. Recent developments in the mechanism of teratogenesis - Electron transfer, reactive oxygen species, and antioxidants, in: *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 567–580. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9\\_39](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_39)
- Krasniqi, V., Dimovski, A., Domjanovic, I.K., Bilić, I., Božina, N., 2016. How polymorphisms of the cytochrome P450 genes affect ibuprofen and diclofenac metabolism and toxicity. *Arh Hig Rada Toksikol* 67, 1-8. Doi: 10.1515/aiht-2016-67-2754.
- Kristensen, D.M., Mazaud-Guittot, S., Gaudriault, P., Lesné, L., Serrano, T., Main, K.M., Jégou, B. 2016. Analgesic use-prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Natural Reviews endocrinology* 12:381-393. Doi:10.1038/nrendo.2016.55.
- Kunkel, U., Radke, M., 2012. Fate of pharmaceuticals in rivers: Deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water Res.* 46, 5551–5565. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.033>
- Kupsco, A., Schlenk, D., 2015. Oxidative stress, unfolded protein response, and apoptosis in developmental toxicity. *International review of cell and molecular biology* 317, 1–66.

<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.02.002>

- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental pollution*. 163:287303. <http://doi:10.1016/j.envpol.2011.12.034>
- Li, Y., Song, W., Fu, W., Tsang, D.C.W., Yang, X., 2015. The roles of halides in the acetaminophen degradation by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment: Kinetics, mechanisms, and products analysis. *Chem. Eng. J.* 271, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.02.090>
- Lindim, C., de Zwart, D., Cousins, I.T., Kutsarova, S., Kühne, R., Schüürmann, G., 2019. Exposure and ecotoxicological risk assessment of mixtures of top prescribed pharmaceuticals in Swedish freshwaters. *Chemosphere* 220, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.118>
- Liu, S., Ding, R., Nie, X., 2019. Assessment of oxidative stress of paracetamol to *Daphnia magna* via determination of Nrf1 and genes related to antioxidant system. *Aquat. Toxicol.* 211, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.014>
- Lolić, A., Paíga, P., Santos, L.H.M.L.M., Ramos, S., Correia, M., Delerue-Matos, C., 2015. Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk. *Science of The Total Environment* 508, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.097>
- Luja-Mondragón, M., Gómez-Oliván, L.M., SanJuan-Reyes, N., Islas-Flores, H., Orozco-Hernández, J.M., Heredia-García, G., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., 2019. Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes. *Sci. Total Environ.* 660, 751–764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.072>
- Luo, Y., Guo, W., Hao Ngo, H., Nghiem, L.D., Faisal, I. H., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*. 473-474, 619-641.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

Mallet, Ch., Daulhac, L., Bonnefont, J., Ledent, C., Etienne, M., Chapuy, E., Libert, F., Eschalier, A., 2008, Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain*, 139:190-200. Doi: 10.1016/j.pain.2008.03.030.

Marchlewicz, A., Guzik, U., Wojcieszynska, D., 2015. Over-the-Counter Monocyclic Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Environment-Sources, Risks, Biodegradation. *Water, air, and soil pollution* 226, 355. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2622-0>

Mazaleuskaya, L.L., Theken, K.N., Gong, L., Thorn, C.F., FitzGerald, G.A., Altman, R.B., Klein, T.E., 2015. PharmGKB summary: Ibuprofen pathways. *Parmacogenet Genomics* 25(2): 96-106. Doi: 10/1097/FPC.0000000000000113.

Metcalfe, C.D., Koenig, B.G., Bennie, D.T., Servos, M., Ternes, T.A., Hirsch, R., 2003a. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environmental toxicology and chemistry* 22, 2872–80.

Metcalfe, C.D., Miao, X.-S., Koenig, B.G., Struger, J., 2003b. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental toxicology and chemistry* 22, 2881–9.

Meyer, B., Pailler, J.-Y., Guignard, C., Hoffmann, L., Krein, A., 2011. Concentrations of dissolved herbicides and pharmaceuticals in a small river in Luxembourg. *Environmental Monitoring and Assessment* 180, 127–146. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1777-9>

Mezzelani, M., Gorbi, S., Fattorini, D., d'Errico, G., Consolandi, G., Milan, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2018. Long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to diclofenac, Ibuprofen and Ketoprofen: Insights into bioavailability, biomarkers and transcriptomic changes. *Chemosphere* 198, 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.148>

Mohapatra, S., Huang, C.H., Mukherji, S., Padhye, L.P., 2016. Occurrence and fate of pharmaceuticals

- in WWTPs in India and comparison with a similar study in the United States. *Chemosphere* 159, 526–535. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.047>
- Mohd Zanuri, N.B., Bentley, M.G., Caldwell, G.S., 2017. Assessing the impact of diclofenac, ibuprofen and sildenafil citrate (Viagra®) on the fertilisation biology of broadcast spawning marine invertebrates. *Marine Environmental Research* 127, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.04.005>.
- Moore, P.K. and Marshall M., Nitric oxide releasing acetaminophen (nitroacetaminophen). *Digestive and liver disease*. 35(suppl. 2): S49-S60. Doi: 10.1016/S1590-8658(03)00052-5.
- Moore, M., Trill, J., Simpson, C., Webley, F., Radford, M., Stanton, L., Maishman, T., Galanopoulou, A., Flower, A., Eyles, C., Willcox, M., Hay, A.D., van der Werf, E., Gibbons, S., Lewith, G., Little, P., Griffiths, G., 2019. Uva-ursi extract and ibuprofen as alternative treatments for uncomplicated urinary tract infection in women (ATAFUTI): a factorial randomized trial. *Clinical Microbiology and Infection* 25, 973–980. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.01.011>
- Murray, K.E., Thomas, S.M., Bodour, A.A., 2010. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ. Pollut.* <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.009>
- Nanau, R.M., Neuman M.G., 2010. Ibuprofen-induced hypersensitivity syndrome. *Translational Research*. 155:275-293. doi:10.1016/j.trsl.2010.01.005
- Nava-Álvarez, R., Razo-Estrada, A.C., García-Medina, S., Gómez-Olivan, L.M., Galar-Martínez, M., 2014. Oxidative stress induced by mixture of diclofenac and acetaminophen on common carp (*Cyprinus carpio*). *Water, Air, Soil Pollut.* 225. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-1873-5>
- Neuman, M.G., Shear, N.H., Malkiewicz, I.M., Taeri, M., Lori E., Shapiro, L. E., Krivoy, N., Haber, J., GOMEZ, M., FISH, J., Cartotto, R., and Cohen, L., 2007. Immunopathogenesis of hypersensitivity syndrome reactions to sulfonamides. *Trans. Res;* 149: 243-253. doi:10.1016/j.trsl.2006.12.001

- Nunes, B., Antunes, S.C., Santos, J., Martins, L., Castro, B.B., 2014. Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 107, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.027>
- Nunes, B., Nunes, J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., 2017. Toxicological effects of paracetamol on the clam *Ruditapes philippinarum*: exposure vs recovery. *Aquat. Toxicol.* 192, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.015>
- Ochoa, D., Prieto-Pérez, R., Roman, M., Talegón, M., Rivas, A., Galicia, I., Abad-Santos, F., Cavaleiro, T. 2015. Effect of gender CYP2C9 and CYP2C8 polymorphisms on the pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers, *Pharmacogenomics* 16 (9): 939-948. Doi: 10.2217/PGS.15.40.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A., 2010. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79, 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.053>
- Parolini, M., Binelli, A., Provini, A., 2011. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1586–1594. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.025>
- Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: Novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.11.002>
- Pérez-Coyotl, I., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Gómez-Oliván, L.M., Gasca- Pérez, E., Martínez-Galero, E., Islas-Flores, H., Pérez-Pastén, B.R., Barceló, D., López de Alda, M., Pérez-Solsona, S., Serra-Roig, M.P., Montemurro, N., Peña-Herrera, J.M., Sánchez-Aceves, L.M., 2019. Polluted water from an urban reservoir (Madín dam, México) induces toxicity and oxidative stress in *Cyprinus carpio* embryos. *Environmental Pollution* 251, 510–521. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.095>

- Petitjean, Q., Jean, S., Gandar, A., Côte, J., Laffaille, P., Jacquin, L., 2019. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Science of The Total Environment* 684, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Piedade, F., Bio, S., Nunes, B., 2020. Effects of common pharmaceutical drugs (paracetamol and acetylsalicylic acid) short term exposure on biomarkers of the mussel *Mytilus* spp. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 73, 103276. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103276>
- Rainsford, K.D., 2013. Ibuprofen: Pharmacology, Therapeutics and Side Effects. Ed. Springer. [Dio.org/10.1007/978-3-0348-0496-7](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0496-7). ISBN 978-3-0348-0496-7 pags 5-7.
- Rawson, D.M., Zhang, T., Kalicharan, D., Jongebloed, W.L., 2000. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aquac. Res.* 31, 325–336. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00401.x>
- Reed, G.W., Abdallah, M.S., Shao, M., Wolski, K., Wisniewski, L., Yeomans, N., Lüscher, T.F., Borer, J.S., Graham, D.Y., Husni, M.E., Solomon, D.H., Libby, P., Menon, V., Lincoff, A.M., Nissen, S.E., 2018. Effect of Aspirin Coadministration on the Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen. *Journal of the American College of Cardiology* 71, 1741–1751. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.02.036>
- Reinholds, I., Pugajeva, I., Zacs, D., Lundanes, E., Rusko, J., Perkons, I., Bartkevics, V., 2017. Determination of acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in aquatic samples by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry combined with carbon nanotubes-based solid-phase extraction. *Environmental Monitoring and Assessment* 189, 568.

<https://doi.org/10.1007/s10661-017-6304-9>

- Rivera-Jaimes, J.A., Postigo, C., Melgoza-Alemán, R.M., Aceña, J., Barceló, D., López de Alda, M., 2018. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 613–614, 1263–1274. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.134>
- Rowden A.K., Norvell, J., Eldridge, D.L., Kirk, M.A., 2005. *The Medical Clinics of North America.* 89: 1145-1159. doi:10.1016/j.mcna.2005.06.009
- Sagristà, E., Larsson, E., Ezoddin, M., Hidalgo, M., Salvadó, V., Jönsson, J.Å., 2010. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in sewage sludge by direct hollow fiber supported liquid membrane extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 6153–6158. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.08.005>
- Samaras, V.G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Gatidou, G., Lekkas, T.D., 2010. Determination of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewater by gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 90, 219–229. <https://doi.org/10.1080/03067310903243936>
- Santos, L.H.M.L.M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., Montenegro, M.C.B.S.M., 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 461–462, 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>
- Sawant, P.B., Bera, A., Dasgupta, S., Sawant, B.T., Chadha, N.K., Pal, A.K., 2014. p53 dependent apoptotic cell death induces embryonic malformation in *Carassius auratus* under chronic hypoxia. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102650>
- Shanmugam, G., Sampath, S., Selvaraj, K.K., Larsson, D.G.J., Ramaswamy, B.R., 2014. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Indian rivers. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 921–931. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1957-6>



- Sharma, Ch.V. and Mehta, V., 2014. Paracetamol: Mechanisms and updates. Revalidation for anaesthetists. 14(4) 153-158. Doi: 10.1093/bjaceaccp/mkt049.
- Shraim, A., Diab, A., Alsuhaimeh, A., Niazy, E., Metwally, M., Amad, M., Sioud, S., Dawoud, A., 2017. Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. Arab. J. Chem. 10, S719–S729. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.11.014>
- Smith, H.S., 2009. Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. Pain Physician 12, 269–280.
- Smyth, E.M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., FitzGerald, G. A., 2009. Prostanoids in health and disease. J. Lipid Res, 50(Suppl): S423-S428. Doi: 10.1194/jlr.R800094-JLR200
- Solomon D.H., Husni, M.E., Libby, P.A., Yeomans N.D., Lincoff, A.M., Lüscher, T.F., Menon V, Brennan, D.M., Wisniewski L.M., Nissen, S.E., Borer J.S., 2017. The Risk of Major NSAID Toxicity with Celecoxib, Ibuprofen, or Naproxen: A Secondary Analysis of the PRECISION Trial. The American Journal of Medicine. 130:1415–1422. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.06.028>
- Stegeman, J.J., Livingstone, D.R., 1998. Forms and functions of cytochrome P450. Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology 121, 1–3.
- Subedi, B., Lee, S., Moon, H.B., Kannan, K., 2014. Emission of artificial sweeteners, select pharmaceuticals, and personal care products through sewage sludge from wastewater treatment plants in Korea. Environ. Int. 68, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.006>
- Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 2013. , OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Timme-Laragy, A.R., Sibel I. Karchner, S.I., Franks, D.G., Matthew J. Jenny, M.J., Rachel C. Harbeitner, R.C., Goldstone, J.V., McArthur A. G., and Hahn, M. E., 2012. Nrf2b, Novel Zebrafish Paralog of Oxidant-responsive Transcription Factor NF-E2-related Factor 2 (NRF2). THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287 (7): 4609–4627. doi 10.1074/jbc.M111.260125
- Thomas, P.M., Foster, G.D., 2005. Tracking acidic pharmaceuticals, caffeine, and triclosan through the

- wastewater treatment process. *Environmental toxicology and chemistry* 24, 25–30.
- Thummel, K.E., Slattery, J.T., Ro, H., Chien, J.Y., Nelson, S.D., Lown, K.E., Watkins, P.B., 2000. Ethanol and production of hepatotoxic methabolite of acetaminophen in healthy adults. *Clinical pharmacology and therapeutics* 67(6):591-599. Doi: 10.1067/mcp.2000.106574.
- Vad, N.M., Yount, G., Moore, D., Weidanz, J., Moridan, M.Y., 2009. Biochemical mechanism of acetaminophen (APAP) induced toxicity in melanoma cell lines. *J. Pharm. Sci.* 98, 1409–1425. <https://doi.org/10.1002/jps.21505>
- Wang, Y., Li, Y., Hu, A., Rashid, A., Ashfaq, M., Wang, Y., Wang, H., Luo, H., Yu, C.P., Sun, Q., 2018. Monitoring, mass balance and fate of pharmaceuticals and personal care products in seven wastewater treatment plants in Xiamen City, China. *J. Hazard. Mater.* 354, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.064>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.004>
- Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K., 2009. Gene expression analysis in zebrafish embryos: A potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1970–1978. <https://doi.org/10.1897/08-627.1>
- Wells, P.G., Bhuller, Y., Chen, C.S., Jeng, W., Kasapinovic, S., Kennedy, J.C., Kim, P.M., Laposa, R.R., McCallum, G.P., Nicol, C.J., Parman, T., Wiley, M.J., Wong, A.W., 2005. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicology and applied pharmacology* 207, 354–66. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.061>
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591–625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>
- Will, Y., Shields, J.E., Wallace, K.B., 2019. Drug-Induced Mitochondrial Toxicity in the Geriatric

Population: Challenges and Future Directions. *Biology* 8, 32.  
<https://doi.org/10.3390/biology8020032>

Xu, J.J., Hendriks, B.S., Zhao, J., de Graaf, D., 2008. Multiple effects of acetaminophen and p38 inhibitors: Towards pathway toxicology. *FEBS Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.063>

Yao, B., Yan, S., Lian, L., Yang, X., Wan, C., Dong, H., Song, W., 2018. Occurrence and indicators of pharmaceuticals in Chinese streams: A nationwide study. *Environ. Pollut.* 236, 889–898.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.032>

Yu-Chen Lin, A., Panchangam, S.C., Chen, H.-Y., 2010. Implications of human pharmaceutical occurrence in the Sindian river of Taiwan: A strategic study of risk assessment. *J. Environ. Monit.* 12, 261–270. <https://doi.org/10.1039/B903880A>

Zanger, U.M., Turpeinen, M., Klein, K., Schwab, M., 2008. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392, 1093–1108. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2291-6>

Żur, J., Piński, A., Marchlewicz, A., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszńska, D., Guzik, U., 2018. Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen-toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environmental science and pollution research international* 25, 21498.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-2517-x>

(<http://www.beta.inegi.org.mx/temas/estructura/>).