



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Química

PRESENTA

**“Evaluación de los efectos en la expresión génica de *Danio rerio* por la
exposición a un efluente Hospitalario”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS PRESENTA**

M.C.B.M. Karina Elisa Rosales Pérez

Tutores:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Olivan

Dr. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez

Dra. Hariz Islas Flores

Toluca, Estado de México

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	1
1 MARCO TEORICO	2
1.1 Efluentes Hospitalarios	2
1.2 Impacto ambiental de los efluentes hospitalarios.....	3
1.3 Remoción de contaminantes	4
1.4 <i>Danio rerio</i> , modelo biológico	5
1.5 Estrés oxidativo	8
1.6 Novel tank test en <i>Danio rerio</i> (Evaluación conductual)	9
1.7 Acetilcolinesterasa.....	11
2 JUSTIFICACIÓN.....	13
3 HIPÓTESIS	14
4 OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo General.....	14
4.2 Objetivos específicos	14
5 METODOLOGÍA.....	15
5.1 Diseño del estudio	15
5.2 Caracterización fisicoquímica y cuantificación de microcontaminantes	16
5.3 Metodología para estudio en embriones	18
5.3.1 Mantenimiento y adaptación de los peces para estudio en embriones.....	18
5.3.2 Colecta de embriones	19
5.3.3 Exposición de los embriones	21
5.3.4 Alteraciones al desarrollo embrionario y efecto teratogénico	21
5.3.5 Embrioletalidad	21
5.3.6 Estrés oxidativo en embriones.....	23
5.3.7 Evaluación de Proteínas carboniladas	24
5.3.8 Determinación del grado de lipoperoxidación	25
5.3.9 Contenido de hidroperóxidos	25
5.3.10 Actividad enzimática de catalasa	25

5.3.11	Actividad enzimática de SOD	26
5.3.12	Actividad de glutatión peroxidasa	26
5.3.13	Determinación de proteínas totales	26
5.3.14	Validez del estudio y análisis estadístico	26
5.4	Metodología para el estudio en adultos de <i>Danio rerio</i>	27
5.4.1	Exposición de adultos de <i>Danio rerio</i>	27
5.4.2	Novel Tank Test	28
5.4.3	Eutanasia y disección	28
5.4.4	Actividad de acetilcolinesterasa	29
5.4.5	Estrés oxidativo en adultos de <i>Danio rerio</i>	30
5.4.6	Evaluación de la expresión génica	31
5.5	Aprobación ética.....	36
6	RESULTADOS.....	36
6.1	Resultados de la caracterización fisicoquímica y cuantificación de contaminantes.....	36
6.2	Resultados de embriotoxicidad y teratogenicidad	39
6.3	Actividad antioxidante inducida por el efluente en embriones	44
6.4	Daño oxidativo inducido por el efluente hospitalario en embriones	45
6.5	Resultados de comportamiento de adultos de <i>Danio rerio</i> por exposición al efluente hospitalario.....	47
6.6	Niveles de Acetilcolinesterasa en cerebro de <i>Danio rerio</i>	49
6.7	Resultados de actividad antioxidante en adultos de <i>Danio rerio</i>	50
6.8	Resultados de oxidación celular en <i>Danio rerio</i>	53
6.9	Correlación de Pearson evaluado en cerebro, entre los biomarcadores de daño oxidativo y biomarcadores de neurotoxicidad.....	56
6.10	Evaluación de la expresión génica en órganos de <i>Danio rerio</i>	57
7	DISCUSIÓN	58
8	CONCLUSION	65
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Parámetros de la calidad del agua.....	19
Tabla 2 Componentes de reacción de transcripción reversa	33
Tabla 3 Secuencias de primers, temperaturas de annealing y tamaño del producto en pares de bases (pb).	34
Tabla 4. Condiciones para la PCR.....	35
Tabla 6 Caracterización fisicoquímica del efluente hospitalario.....	37
Tabla 7 Microcontaminantes identificados en el efluente hospitalario	38
Tabla 8 Datos de mortalidad y malformación en <i>Danio rerio</i> por exposición al efluente hospitalario.	40

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Diseño metodológico.....	15
Fig. 2 Estadios embrionarios (0.2hpf – 4.7 hpf) (Charles B. Kimmel et al., 1995) .	20
Fig. 3 Formato de evaluación de las alteraciones al desarrollo embrionario y efecto teratogénico.....	22
Fig. 4 Evaluación de estrés	24
Fig. 5 Diagrama de los ciclos de PCR tiempo real en el termociclador.	35
Fig. 6 Características morfológicas de los embriones después de la exposición ..	42
Fig. 7 Gráfica de Kaplan – Meier.....	42
Fig. 8 Puntuaciones de la morfología de <i>Danio rerio</i> en respuesta por exposición al efluente hospitalario.	43
Fig. 9 Actividad de SOD y CAT en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos al efluente hospitalario por 48, 72 y 96hpf.	45
Fig. 10 Niveles de LPx, HPx, y POx en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos al efluente hospitalario a 48, 72 u 96hpf.	47
Fig. 11 Cambios de comportamiento observados en <i>Danio rerio</i> expuestos a 0.1, 2.5 y 3.5% de efluente hospitalario..	49
Fig. 12 Actividad de acetilcolinesterasa en cerebros de <i>Danio rerio</i>	50
Fig. 13 Actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX en cerebro.....	51
Fig. 14 Actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX en branquias	51

Fig. 15 Actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX en hígado	52
Fig. 16 Actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX en intestino.....	53
Fig. 17 Niveles de lipoperoxidación (LPX), proteínas carboniladas (POX) e hidropéroxidos (HPX) en cerebro.....	54
Fig. 18 Niveles de lipoperoxidación (LPX), proteínas carboniladas (POX) e hidropéroxidos (HPX) en branquias	54
Fig. 19 Niveles de lipoperoxidación (LPX), proteínas carboniladas (POX) e hidropéroxidos (HPX) en hígado	55
Fig. 20 Niveles de lipoperoxidación (LPX), proteínas carboniladas (POX) e hidropéroxidos (HPX) en intestino.....	55
Fig. 21 Correlación de Pearson de biomarcadores de estrés oxidativo y neurotoxicidad en cerebro de <i>Danio rerio</i>	57
Fig. 22 Expresión relativa de sod, cat, gpx, nrf1 y nrf2 en cerebro, branquias, hígado e intestino por exposición al efluente hospitalario.....	58

RESUMEN

Los hospitales consumen una gran cantidad de agua por día, así mismo es considerable la cantidad de aguas residuales que genera, y más preocupante la diversidad de contaminantes que éstas contienen (Verlicchi *et al.*, 2010; Magdaleno *et al.*, 2014; Laffite *et al.*, 2016; Pérez-Alvarez *et al.*, 2018). El problema se genera debido a que la mayoría de los hospitales no cuentan con sistemas de tratamiento de agua adecuados por lo tanto son liberados a los sistemas acuáticos aguas que contienen contaminantes emergentes (Chagas *et al.*, 2019).

Diversas pruebas en organismos acuáticos que ponen de manifiesto daño a diversos organismos acuáticos se han realizado, entre éstas, evaluación de los efectos genotóxicos y mutagénicos, evaluación de la citotoxicidad, alteraciones hematológicas e histológicas, embriotoxicidad y estrés. Alimba *et al.* (2017), por ejemplo, demostraron que seis concentraciones (0,5–3,0 %) de un efluente hospitalario indujeron mortalidad y citogenotoxicidad en *Clarias gariepinus* (Alimba, Ajiboye and Fagbenro, 2017), Luja-Mondragón *et al.* (2019) indicaron que siete concentraciones (3–6 %) de un efluente hospitalario de México alteraron el desarrollo embrionario de *Cyprinus carpio* a través de un mecanismo de estrés oxidativo (Luja-Mondragón *et al.*, 2019a). Cuando se expone un organismo a una mezcla de sustancias de diversa naturaleza se desconoce los daños que pueda generar en éste y el mecanismo que el organismo utilice contra los contaminantes (Andrade, Aschner and Marreilha dos Santos, 2017). A pesar de que existen diversos estudios al respecto, la predicción de las consecuencias a la salud es un reto al que nos enfrentamos.

1 MARCO TEORICO

1.1 Efluentes Hospitalarios

En un hospital se realizan tanto actividades asistenciales, terapéuticas, de diagnóstico, rehabilitación y cuidados, mismas que conlleva el uso de una gran variedad de sustancias, entre las que encontramos fármacos, detergentes, desinfectantes, y solventes. De las cuales una vez concluido su uso o bien, que han sido excretadas a través de heces u orina; se localizan en el efluente del hospital debido a la red de tratamiento de aguas residuales con las que cuenta (Thomas *et al.*, 2007; Langford and Thomas, 2009). Una variedad de estudios realizados a este tipo de efluentes ha demostrado presencia importante de fármacos analgésicos como acetaminofén, diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno; antibióticos como ciprofloxacino, claritromicina, azitromicina; antidiabéticos como glibenclamida, metformina entre otros fármacos, también se han detectado metales como arsénico, cadmio, cobre, mercurio en efluentes provenientes de hospitales. (Verlicchi *et al.*, 2012; Olvera-Néstor *et al.*, 2016; Tenorio-Chávez *et al.*, 2020).

En las plantas tratadoras de agua las sustancias que se localizan en mayor proporción son los farmacéuticas, ya sea como principio activo o en forma de metabolitos, seguidos de aquellos compuestos desechados por la industria alimentaria (López-Pacheco *et al.*, 2019). Y generalmente la planta tratadora de agua de los hospitales se conecta con la planta tratadora de aguas municipal, sin considerar que muchos fármacos y sustancias provenientes de hospitales son resistentes a los tratamientos convencionales (Verlicchi *et al.*, 2010; Orias and Perrodin, 2013) y son desechados en el alcantarillado municipal.

La legislación mexicana aun no considera el impacto ecotoxicológico que los contaminantes emergentes (sustancia de diversa naturaleza cuyo impacto en el medio ambiente y cuerpo humano se desconoce) pudieran tener sobre los cuerpos de agua. Los parámetros considerados por la legislación, no solo mexicana si no de

varios países son indicadores fisicoquímicos como pH, temperatura, demanda química de oxígeno, demanda bioquímica de oxígeno, sólidos totales suspendidos e indicadores microbiológicos como coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* (CONAGUA, 1997; SEMARNAT, 1998).

Se debe considerar que la presencia de sustancias diversas en el efluente implica que cada una de ellas tiene su propio valor de peso molecular, solubilidad, polaridad, estabilidad, vida media y su comportamiento e interacción el mismo resulta desconocido (Verlicchi *et al.*, 2010).

1.2 Impacto ambiental de los efluentes hospitalarios

Los efluentes hospitalarios implican un riesgo biológico debido a la presencia de microorganismos patógenos cuyo origen se deriva de fluidos corporales y heces de personas infectadas. La presencia de antibióticos en estos efluentes induce a las bacterias a generar resistencia antimicrobiana (Varela *et al.*, 2014).

Con respecto al riesgo químico la OMS dice que los establecimientos de la salud contribuyen con el 5% de la liberación de mercurio a los cuerpos de agua (WHO, 2013), en dicho reporte también mencionan el impacto toxicológico que tiene la presencia de metales como arsénico, plomo, mercurio, de sustancias desinfectantes como formalina, y moléculas iodadas sobre organismos acuáticos, debido a que muchos de ellos son persistentes y tienden a bioacumularse.

Ante la necesidad de evaluar el impacto ambiental de estos contaminantes se han realizado pruebas toxicológicas en diversas especies acuáticas, una de ellas es *Cyprinus carpio* debido a su interés comercial en diversas ciudades de México; esta especie acuática ha sido evaluada desde su estadio embrionario en el cual se han detectado problemas como escoliosis, malformación de la corda, hiperplasia de boca y retraso en la eclosión. (Luja-Mondragón *et al.*, 2019a). También se ha evaluado el daño en embriones de anfibios como *Xenopus laevis* en el que reportan

microcefalia, edemas cardiaco y facial, malformaciones oculares y daño en intestino; así como alteraciones en biomarcadores de estrés oxidativo.(Pérez-Alvarez *et al.*, 2018)

1.3 Remoción de contaminantes

Las plantas de tratamiento de agua convencionales no son capaces de remover contaminantes emergentes, la mayoría de estas sustancias son disruptores endócrinos, lo que hace que sea un problema ecológico y de salud aún mayor. Un disruptor endócrino es aquella sustancia que interfiere con la síntesis, transporte y función de las hormonas naturales presentes en el organismo gracias a las cuales se mantienen los procesos homeostáticos (Kavlock *et al.*, 1996). Estos compuestos son liberados al medio ambiente acuático sin una regulación estricta que permita su detección y marque límites permisibles.

El tratamiento de las aguas residuales es un proceso importante debido si no se tiene cuidado se agregan sustancias a un ecosistema; si bien es cierto que la incorporación de estas a cuerpos de agua implica una disminución de la concentración, se ha detectado la presencia de dichos contaminantes dentro de las unidades de $\mu\text{g/L}$ a ng/L (Tenorio-Chávez *et al.*, 2020).

Un proceso comúnmente usado para el tratamiento de aguas residuales es con el uso de cloruro férrico y/o polímeros que desestabilicen los materiales coloidales y hace que las pequeñas partículas se aglomeren en flóculos (Amuda and Alade, 2006). Esta técnica ha mostrado deficiencias en la remoción de fármacos y productos para el cuidado personal así mismo estudios han demostrado que esta técnica pudiera mejorar usando carbono orgánico hidrofóbico disuelto (Adams *et al.*, 2002; Petrovic *et al.*, 2003; Westerhoff *et al.*, 2005).

Otra técnica de remoción de contaminantes es la biológica que se basa en la formación de una biomasa para posteriormente separar la fase acuosa del sedimento, la desventaja de esta técnica es que se remueven principalmente los componentes polares (Urase and Kikuta, 2005). Los procesos de biodegradación

han mostrado ineficacia para remover los contaminantes emergentes, especialmente estrógenos; estudios realizados por Servos y colaboradores, sugiere que para una mejor remoción de estos residuos se incremente el tiempo de tratamiento, lo que implica plantearse el rediseño de las plantas tratadoras que permita aumentar a 35 días (Servos *et al.*, 2005).

Otras técnicas de remoción de residuos involucran fotólisis ultravioleta, filtración por membrana, intercambio iónico, nanofiltración, entre otras. Todas ellas mientras mejoran la eliminación de ciertas sustancias, dejan presentes otras tantas; es importante implementar mejores métodos o combinación de tecnologías para mejorar la eliminación de contaminantes (Bolong *et al.*, 2009).

1.4 *Danio rerio*, modelo biológico

Danio rerio o pez cebra es nativo de la India, es un teleosteo perteneciente a la familia de los *Cyprinidae*, la clase de los *Actinopterygii* y la infraclase de los *Teleostei*, que incluye cerca de 26,000 especies (Fang *et al.*, 2009). Es un reproductor prolífico cuyos embriones son transparentes y se desarrollan fácilmente, el pez mide alrededor de 3 cm de largo, es translucido, tiene rayas negras a lo largo de su longitud, los machos se distinguen de las hembras por su coloración amarilla y sus aletas anales más largas (Holtzman *et al.*, 2016). Es un pez diurno y tienen un ritmo de reproducción endógeno que es regulado por la luz, cumpliendo con un ciclo circadiano; el pez desova al inicio del día (Blanco-Vives and Sánchez-Vázquez, 2009).

Es un pez que, en condiciones silvestres, es omnívoro, se alimenta de insectos, larvas de insectos, nematodos, crustáceos y algas filamentosas principalmente (McClure, McIntyre and McCune, 2006); mientras que en el laboratorio los alimentos generalmente están suplementados con camarones de salmuera o gusanos de harina (Spence *et al.*, 2008; Holtzman *et al.*, 2016).

Danio rerio se ha usado como modelo, debido a que mutaciones detectadas en él presentan una copia fenotípica en el humano (Shin and Fishman, 2002), lo que nos proporcionaría genes candidatos y las vías para su evaluación en los humanos. Los órganos del pez cebra son funcional y morfológicamente similares a los del humano, por lo que se espera que estudios en este pez aun en estado embrionario, nos brinden una mirada panorámica de los fenotipos que se pudieran presentar en mutaciones en el humano.

Es un organismo diploide con 25 cromosomas, el tamaño de su genoma se encuentra cerca de los 1 700 Mb (Wixon, 2000).

La secuenciación completa del genoma de *Danio rerio* ha permitido saber que es la especie de vertebrados que más genes codificadores de proteínas tiene, y que posee un mayor número de genes específicos de especie que el humano, probablemente debido a que el antecesor que tienen en común la infra clase *Teleostei* sufrió una duplicación adicional de su genoma completo la cual recibe el nombre de duplicación del genoma específico del teleósteo (TSD Teleost-specific genome duplication). Se sabe que los genomas del ratón y el humano comparten similitudes cromosómicas, pero no así se aceptaba esta afirmación de un pez, pero ahora se sabe que la sintenia entre varios loci cromosómicos existe (Dooley and Zon, 2000). En la actualidad estudios en pez cebra y el humano, han demostrado que un 71.4% de los genes humanos tienen por lo menos un ortólogo en esta especie, lo que abre las puertas para usar al pez como modelo para averiguar algunas funciones de los genes de vertebrados y la caracterización de enfermedades en humanos (Howe *et al.*, 2013).

El éxito de este organismo modelo dentro del laboratorio, radica en su tolerancia a una amplia gama de condiciones ambientales en cautiverio. Su crianza debe de ser en agua alcalina (pH~8.0), es un pez euritermo, es decir que puede desarrollarse a temperaturas muy variables, con un máximo de tolerancia entre 6.7 y 41.7°C (Lawrence, 2007; Aleström *et al.*, 2020), sin embargo la temperatura optima recomendada se encuentra entre los 20 y 30°C (Lawrence and Mason, 2012). Con

respecto a la salinidad se recomienda mantener a la población en un rango entre 0.25-0.75 ppt (Lawrence, 2007). La Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico ha generado lineamientos a seguir, para el estudio de toxicidad de productos químicos en embriones de pez cebra (OECD, 2013a) y para la toxicología de su desarrollo (OECD, 2013b).

Los estudios in vivo generalmente son costosos y requieren demasiado tiempo debido al ciclo biológico del organismo que se esté usando, es aquí donde *Danio rerio* tiene ventajas sobre otros organismos modelo (Chakraborty *et al.*, 2016), debido a que como ya se mencionó con anterioridad, tiene una alta homología fisiológica y genética con el humano, es un organismo susceptible de manipulación genética, además de que tiene un tiempo corto de generación, con sus etapas de desarrollo bien caracterizadas (Chakravarthy *et al.*, 2014). Otro punto a favor del uso de este pez para estudios in vivo es que no se requieren técnicas invasivas para la visualización del fenotipo, gracias a que sus larvas son transparentes (Keller *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2013). Considerando los costos de mantenimiento que requieren estos son considerablemente bajos en comparación con otros organismos. *Danio rerio* tiene amplio campo de estudio también en las ciencias ambientales, en él se han realizado bastantes pruebas de toxicidad aguda, teratogenicidad, esto permite ampliar la gama de enfoques ambientales para la identificación de mecanismos y detección de efectos adversos a corto y largo plazo, estos estudios pueden ser aplicados en el estudio de la determinación de bioconcentración de xenobióticos en embriones, los efectos de la exposición a los mismos, así como el efecto de toxinas en la expresión de sus genes (Scholz *et al.*, 2008).

En 1999 el NIH (National Institutes of Health) financió un proyecto para el estudio de organismos modelo no mamíferos, posteriormente en mayo de ese año se patrocinó un taller denominado “Herramientas genómicas y genéticas para el pez cebra” (Dooley and Zon, 2000), lo que fue la antesala para la creación del ZFIN (Zebrafish Information Network) es un recurso supervisado por National Human Genome Research Institute que difunde información genética, genómica y de

desarrollo así como el mantenimiento de bases de datos de referencia para investigaciones en pez cebra, su sitio web es: <https://zfin.org/>. El ZIRC (Zebrafish International Resource Center) supervisado por el NIH, es un centro que mantiene existencias de mutantes de pez cebra y los distribuye a la comunidad científica, también proporciona recursos informativos a través de internet su sitio web es: <https://zebrafish.org/home/guide.php> (Rasooly *et al.*, 2003).

1.5 Estrés oxidativo

Estrés oxidativo es el daño que se genera cuando se desequilibran los oxidantes y los antioxidantes, a favor de los primeros, concepto dado por Helmut Sies en 1985 (Sies, 2015). Resulta interesante resaltar que los prooxidantes no siempre son tóxicos; en condiciones fisiológicas normales pueden actuar como moléculas de señalización, por lo que al concepto antes mencionado vale la pena adicionar que en el estrés oxidativo se presenta una ruptura del control y señalización fisiológica lo que genera un daño molecular (Jones, 2006).

Cuando la homeostasis redox se altera, hay un aumento de radicales libres los cuales pueden llegar a generar daño oxidativo. Los radicales libres son especies químicas de bajo peso molecular que poseen en el último orbital un orbital no apareado, lo que provoca que sean altamente reactivos y oxidantes (Pisoschi and Pop, 2015). La mayoría de los radicales libres son especies reactivas de oxígeno (EROs); se denominan así a aquellos que incluyen iones oxígeno y peróxido (Lesser, 2006). Las EROs tienen la capacidad de provocar severos daños a la célula cuando se encuentran en exceso, sus principales objetivos son los lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN.

La oxidación de los lípidos provoca la formación de Malondialdehído (MDA), dienos conjugados e hidroperóxidos. El MDA es un buen marcador de daño membranal y generalmente se cuantifica por su reacción con ácido tiobarbitúrico generando sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico que detectables por espectrofotometría

(Finaud, Lac and Filaire, 2006); a pesar de que el método no es específico para MDA, es aceptado como un marcador de lipoperoxidación (Rimbach *et al.*, 1999).

Las EROs inducen daño a las proteínas generando grupos carbonilo; por lo que la cuantificación de la formación de grupos carbonilo es indicativo de daño a proteínas. Las proteínas totales también son medidas para usar la relación carbonilo/proteína lo que es un índice más preciso de daño oxidativo en proteínas (Chen, Chang and Wei, 2001).

Para detectar estrés oxidativo también se cuantifica la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPX), con el objetivo de valorar la calidad de la protección antioxidante. SOD es la enzima que cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno y CAT reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno molecular. Por otro lado, GPX cataliza la reducción de hidroperóxidos usando GSH como donador de electrones. Es importante mencionar que la actividad enzimática antioxidante se puede alterar de diferentes formas: en un proceso de adaptación puede aumentar su actividad o bien disminuir si el estrés oxidativo es importante o prolongado (Finaud, Lac and Filaire, 2006).

1.6 Novel tank test en *Danio rerio* (Evaluación conductual)

La similitud fisiológica de *Danio rerio* con los mamíferos y la sensibilidad del pez a agentes exógenos, hacen que este pez pueda ser usado como modelo para el estudio del comportamiento y cómo pueden llegar a afectar los contaminantes emergentes sobre los mismos.

La prueba de Novel tank evalúa los efectos que tiene sobre *Danio rerio* el sometimiento a pruebas estresantes. Levin *et. al* 2007 fue pionero en implementar esta prueba y observó que un pez adulto en observación por 5 minutos para el cincuenta por ciento del tiempo en el fondo del tanque, lo que se ve contrarrestado por la exposición a nicotina (Levin, Bencan and Cerutti, 2007), diversos estudios

relacionados confirman que los ansiolíticos disminuyen esta preferencia por el fondo del tanque (Egan *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2012). El preferir el fondo del tanque es un comportamiento anti depredador, lo que debe entenderse es que el pez no prefiere el fondo si no escapa de la superficie para no ser capturado (Maximino *et al.*, 2012).

Esta prueba se fundamenta en la tendencia natural del pez por su preferencia al fondo cuando se introduce en un nuevo ambiente, posteriormente de forma gradual expande su nado hacia superficies más altas. La evaluación de la posición a lo largo de la dimensión vertical proporciona una métrica rápida de la adaptación del pez y el efecto que pudieran tener sustancias tóxicas sobre su adaptación a un nuevo ambiente (Levin, Bencan and Cerutti, 2007). Durante la prueba la pecera que contiene al organismo de estudio debe de estar en una zona libre de disturbios para evitar alteraciones innecesarias del pez y que estén influyan sobre su comportamiento para evitar desviaciones en los resultados del estudio. Aquí se evalúa la preferencia del pez sobre superficies superiores o inferiores considerándolo como un índice de ansiedad, así como las posiciones cercanas a la pared (tigmotaxis), se mide la actividad total del pez (Maximino *et al.*, 2010).

La ansiedad es la respuesta a un ambiente o estímulos peligrosos, y para evaluarla se considera la geotaxis, tigmotaxis, escototaxis, aumento de la congelación, movimientos operculares y movimientos erráticos (Mezzomo *et al.*, 2016).

La geotaxis es aquel movimiento de preferencia hacia el fondo del tanque, se puede cuantificar por la latencia al fondo, el tiempo transcurrido en la parte inferior, la frecuencia de visitas al fondo o bien la distancia que recorre en esta zona.

La tigmotaxis es la preferencia por permanecer en los bordes y evitar las zonas abiertas o centrales.

Escototaxis se refiere a la preferencia del pez por la obscuridad. Es importante considerar que en las larvas ocurre el fenómeno contrario (escotofobia)

Congelamiento es la falta total de movimiento exceptuando branquias y ojos, se cuantifica evaluando la latencia, frecuencia, ubicación y duración. No debe confundirse con la inmovilidad en cuyo caso si hay un cese de movimiento ocular.

Los movimientos erráticos son aquellos cambios bruscos y rápidos de dirección o velocidad, es una reacción de alarma desencadenada por situaciones de estrés(Kalueff *et al.*, 2013).

1.7 Acetilcolinesterasa

Acetilcolina es un neurotransmisor que regula diversas funciones como la activación cortical (activación fisiológica y psicológica del organismo), estadios de sueño y vigilia, así como procesos de memoria. En el cerebro una de las funciones de la acetilcolina es una reducción de la permeabilidad de los iones potasio; los canales de iones potasio son los responsables de mantener el potencial de membrana y modular la excitabilidad neuronal (Solís, López-Hernández and Cortés-Gasca, 2008).

La acetilcolinesterasa es la enzima responsable de la terminación de la transmisión de impulsos en la sinapsis colinérgicas mediante la hidrólisis de acetilcolina (Barnard, 1970). Esta enzima se localiza principalmente en la hendidura sináptica, sitio donde se libera la acetilcolina. El sitio activo de esta enzima tiene dos dominios, uno esteárico y otro aniónico (Dvir *et al.*, 2010)

La reacción entre estas dos moléculas ocurre en dos etapas, en una primera etapa la acetilcolina es atraída al sitio activo de la enzima, esta unión va a ser complementada por el sitio esteárico y una vez que se establecen puentes de hidrógeno entre los grupos ácido y básico presente en el sitio esteárico y la acetilcolina se forma el complejo enzima-sustrato. La última parte de esta reacción se origina con la hidrólisis de la molécula de acetilcolina lo que provoca que la colina

se desprenda de la enzima acetilada, dando como resultado la liberación y la restitución de la enzima (Soreq, 2001).

La acetilcolinesterasa mecánicamente es una serina hidrolasa, que contiene una triada catalítica: serina, histidina y un residuo ácido (glutamato) lo que la diferencia del resto de las serinas proteasas cuyo residuo ácido es el aspartato, por estas propiedades catalíticas es que sufre inhibición por inhibidores carbamatos y organofosforados.

Otra función menos explorada de acetilcolinesterasa es la activación de neuronas dopaminérgicas, se ha detectado la liberación de esta enzima de las dendritas de las neuronas dopaminérgicas; el grupo de trabajo de Llinas (Llinas and Greenfield, 1987) observó que una especie recombinante de esta enzima es capaz de aumentar la liberación de dopamina de las neuronas dopaminérgicas.

2 JUSTIFICACIÓN

Los hospitales consumen grandes cantidades de agua por día, de igual forma generan cantidades importantes de aguas residuales, sin embargo, ante la falta de regulación que marque límites a los contaminantes emergentes presentes en estas, es que surge la inquietud de los investigadores por vislumbrar los efectos ecotoxicológicos que dichas sustancias tienen sobre los cuerpos de agua y sus ecosistemas.

Dentro de los contaminantes emergentes en los efluentes hospitalarios destaca la presencia de AINES, corticoesteroides e inhibidores de la bomba de protones, así mismo metales como arsénico, cadmio y mercurio, cuya interacción en el efluente es desconocida, así como los efectos que pudiera provocar en los organismos que se expongan a dicho efluente.

En la literatura se ha reportado que estas sustancias tienen la capacidad de inducir estrés oxidativo por la elevada generación de especies reactivas de oxígeno, el cual puede estar relacionado a alteraciones en el desarrollo, embriotoxicidad, y/o teratogenicidad y alteraciones en el comportamiento así como enzimático como es el caso de acetilcolinesterasa, importante enzima del sistema nervioso central y periférico. Por lo que genera el interés de conocer los mecanismos químicos y moleculares en el estrés oxidativo, el daño al ADN y las alteraciones presentes en proteínas y enzimas.

En relación con estos reportes toxicológicos, aun es insuficiente la información disponible de los contaminantes emergentes para así poder desarrollar estrategias adecuadas para su tratamiento, remoción y control.

Es importante la estimación del peligro asociado a la presencia de estos contaminantes en los cuerpos de agua, por lo que la búsqueda de nuevos biomarcadores de efecto y el empleo de pruebas de exposición aguda es fundamental para establecer dichas consecuencias.

HIPÓTESIS

La exposición de *Danio reio* al efluente hospitalario será capaz de inducir alteraciones en el desarrollo embrionario, tener un efecto teratogénico y provocar neurotoxicidad en adultos así como alteraciones en su comportamiento; con respecto a la expresión de genes, este efluente generará una respuesta positiva temprana de aquellos genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la toxicidad inducida por un efluente hospitalario sobre embriones y adultos de *Danio rerio*

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar alteraciones al desarrollo embrionario y el potencial teratogénico inducido por un efluente hospitalario sobre *Danio rerio*.
2. Evaluar el estrés oxidativo inducido por un efluente hospitalario en etapas tempranas de *Danio rerio*.
3. Evaluar la neurotoxicidad, estrés oxidativo y expresión génica, inducido por un efluente hospitalario sobre adultos de *Danio rerio*.

4 METODOLOGÍA

4.1 Diseño del estudio

En el presente proyecto de investigación se evaluaron los estadios embrionario y adulto de *Danio rerio*, con la finalidad de obtener un panorama completo para evaluar el impacto del efluente sobre este organismo. El estudio se divide en tres secciones, las cuales puede visualizar en la Fig. 1.

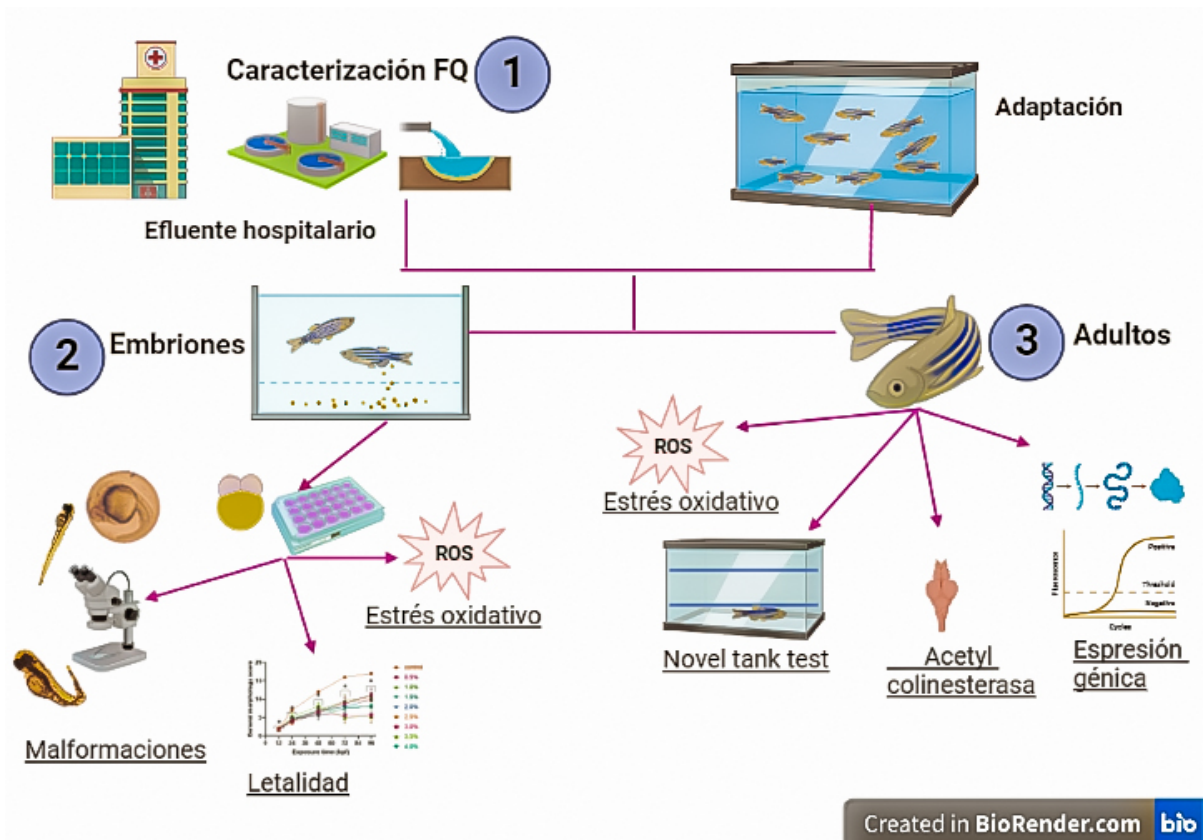


Fig. 1 Diseño metodológico.

En una primera etapa se realiza una caracterización fisicoquímica del efluente para tener una visión panorámica de las características del efluente, entre ellas su pH, conductividad, sólidos totales; también se realiza una determinación de metales y fármacos. Los fármacos buscados se realizan con base en las funciones hospitalarias y fármacos de uso más frecuente.

La segunda etapa se realiza con embriones, los cuales se expusieron a ocho concentraciones diferentes del efluente (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0%), mientras que el grupo control recibió el mismo tratamiento que los expuestos, pero en ausencia del efluente. Las pruebas realizadas en embriones fueron: evaluación de la embriotoxicidad y teratogenicidad, evaluación de malformaciones y evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo, así mismo los datos obtenidos nos permitieron la determinación de la concentración letal media (CL50), concentración efectiva media (CE50) e índice de teratogenicidad (IT).

Por último, en la tercera etapa se exponen adultos de *Danio rerio*, y con base en los datos obtenidos en la exposición a embriones se seleccionaron tres concentraciones de exposición (0.1, 2.5 y 3.5) de igual forma a la par se trabajó con un grupo control el cual no se expone al efluente. Las pruebas realizadas en este grupo de estudio fueron: evaluación del estrés oxidativo, determinación de la expresión génica, evaluación del comportamiento y determinación de los niveles de acetilcolinesterasa.

4.2 Caracterización fisicoquímica y cuantificación de microcontaminantes

Los parámetros fisicoquímicos como temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, pH, cloruro, fluoruro y dureza se realizó utilizando la metodología de las normas oficiales mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 (que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales vertidas a aguas y recursos nacionales) y la NOM-002-SEMARNAT-1996 (que establece los límites

máximos permisibles de contaminantes en las aguas residuales vertidas a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal).

Para la caracterización de microcontaminantes, nos focalizamos en dos grandes grupos: metales y contaminantes emergentes de tipo farmacéutico. La metodología usada fue la descrita por López-Serna *et.al* (2012), la separación cromatográfica se realizó mediante un sistema Acquity UHPLC y una columna BEH C18 de fase reversa (2,1 mm x 100 mm, tamaño de partícula 1.7 μ m), ambos de Waters Corporation (López-Serna, Petrović and Barceló, 2012). Los compuestos analizados en modo de ionización positiva (IP) se eluyeron utilizando una fase móvil compuesta por acetonitrilo (ACN) y ácido fórmico acuoso al 0.1%. La elución comenzó con ACN al 10%; se incrementó con una rampa lineal a 7.5 min durante 6.2 min; aumentó aún más hasta el 100% de ACN durante 0.35 min; y se mantuvo isocrático durante 0.5 min. El tiempo de ejecución total para el análisis fue de 8 min. En el modo de ionización negativa (IN), los compuestos se eluyeron con ACN: MeOH (1:1, v/v) y acetato de amonio 10 mM. La elución se incrementó linealmente del 20 % de ACN al 80 % de ACN durante 1.3 min, se aumentó aún más hasta el 90 % de ACN durante 0.7 min y luego se mantuvo isocrática durante 2 min. El tiempo total de ejecución fue de 5 min. El caudal tanto para la IP como la IN fue de 0.4 mL/min con un volumen de inyección de 20 mL. Las muestras se mantuvieron a 15 °C en la estación de inyección y la columna a 30 °C.

Para la mayoría de los compuestos, se monitorearon dos transiciones de monitoreo de reacción seleccionadas entre el ion precursor y los iones de fragmento más abundantes. El límite de detección (LOD), estimado como la concentración de analito que produce una relación señal/ruido de 3, representa la media de los LOD para cada analito. El límite de cuantificación (LOQ) se estimó como la concentración de analito que produce una relación señal-ruido de 10.

Con respecto a la identificación de metales, se realizó la cuantificación de 8 metales (As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn). Los metales se cuantificaron utilizando el método propuesto por Eaton et al. (1995). A 0,5 mL de efluente se le añadieron 2 mL de

ácido nítrico concentrado. Las muestras se colocaron en un autoclave a 120 C y 15lb de presión durante 1 hora. Luego se filtraron, se diluyeron con agua desionizada y se leyeron en un espectrofotómetro de absorción atómica Varian AA1475 (Melbourne, Australia). Los resultados se obtuvieron por interpolación en una curva tipo con la solución de absorción atómica estándar para cada metal (1 mg/L).

4.3 Metodología para estudio en embriones

4.3.1 Mantenimiento y adaptación de los peces para estudio en embriones

Adultos de *Danio rerio*, del tipo salvaje (cepa AB) se mantuvieron en tanques de 100L con una relación de 1 pez por litro. Todas las peceras tenían agua de grifo sin cloro, filtrada con carbón activado y esterilizada con rayos ultravioleta. Se mantuvo una temperatura constante de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, con ciclos de luz/obscuridad (14h/10h). Diario se evaluaban los parámetros de calidad del agua mencionados en la Tabla1. Los peces se alimentaban dos veces al día con hojuelas de espirulina Ocean nutrition y suplementados con crustáceos en salmuera (*Artemia sp Napili*) para inducir el desove (Prueba n.º 236: Prueba de toxicidad aguda de los embriones de peces (FET), 2013).

Una vez que los peces se adaptaron, se separaron aquellos de mayor tamaño y se sexuaron, con la finalidad de separarlos para poder inducirlos al desove y coleccionar sus ovocitos.

Tabla 1 Parámetros de la calidad del agua

Parámetro	Valor \pm DE
pH	7.2 \pm 0.14
Dureza	92 \pm 4 mg/L CaCO ₃
Amoniaco no ionizado	0.003 \pm 0.0005 mg/L
Nitratos	2.7 \pm 0.4 mg/L
Nitritos	0.06 \pm 0.006 mg/L
Oxígeno disuelto	12.3 \pm 0.6 mg/L
Conductividad	385 \pm 27 μ S/cm
Salinidad	0.7 \pm 0.3 g/L

4.3.2 Colecta de embriones

La noche previa al desove se seleccionaron 15 peces cebra adultos en una proporción de 1 hembra: 2 machos, con un tamaño de 4 a 5 cm y se colocaron en las cámaras de reproducción. El proceso de fertilización se realizó *in situ* en el acuario de la Facultad de Química UAEMex, el sistema se localizó en un acuario cerrado, contaba con temperatura a 27°C, filtros y difusores de aire así como de una malla con poros de 0.5mm que impedía que los peces adultos ingirieran los ovocitos.

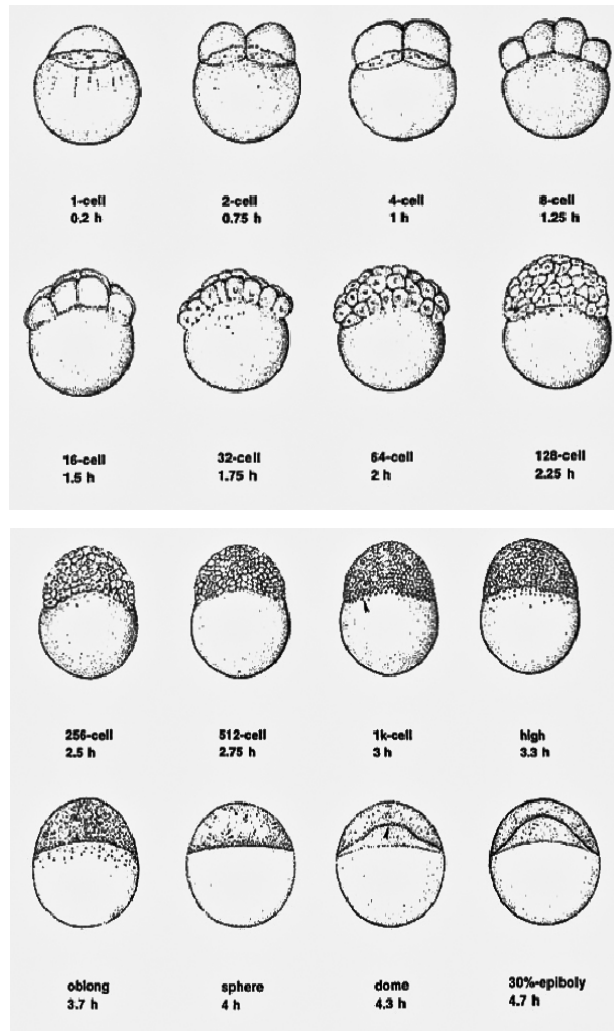


Fig. 2 Estadios embrionarios (0.2hpf – 4.7 hpf) (Charles B. Kimmel et al., 1995)

El desove fue estimulado por luz natural, se recolectaron los ovocitos 1 hora post fecundación (hpf) y se lavaron con agua y solución salina (Westerfield, 2007). Posteriormente, con el uso del microscopio estereoscópico y con base en lo descrito por Kimmel *et al.* (1995) se seleccionaron solo aquellos organismos en etapa de blástula (Charles B. Kimmel *et al.*, 1995) 2.5 hpf (Fig. 2). Por último, estos embriones se colocaron en placas con agua ultrapura y se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar el estadio de esfera 4 hpf (Fig.2).

4.3.3 Exposición de los embriones

Las muestras del efluente hospitalario fueron tratadas previamente con tiosulfato de sodio para eliminar el hipoclorito presente a una concentración de 1 mg/L durante 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, el efluente se mantuvo en reposo en un contenedor obscuro y protegido de la luz con aireación continua por 24 horas. Las concentraciones evaluadas fueron: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0% y adicional un grupo control que carecía de efluente. Con base en lo estipulado en la Guía de la OCDE (2013) [Prueba de toxicidad aguda en embriones de peces FET] se colocaron en microplacas de 24 pocillos 72 embriones en estadio de esfera (un embrión por pocillo). En cada pocillo se colocaron 2 ml de las concentraciones evaluadas en medio reconstituido con sales y anticloro. Las placas se mantuvieron en incubación a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con ciclos de luz/obscuridad (14:10h). A las 12, 24, 48, 72 y 96 h se evaluaron la mortalidad embrionaria, el índice de eclosión y las malformaciones que pudieran estar presentes en los embriones tanto expuestos como control con base en los parámetros establecidos por Kimmel *et. al* (1995).

4.3.4 Alteraciones al desarrollo embrionario y efecto teratogénico

Las malformaciones se expresaron como el porcentaje de embriones con al menos una malformación en comparación con el grupo control y se asignaron puntajes de acuerdo con la escala de Hermsen *et al.* (2011) y Kimmel *et. al* (1995) (Charles B Kimmel *et al.*, 1995; Hermsen *et al.*, 2011). El formato usado para realizar esta evaluación se muestra en la Fig. 3; dicho formato fue usado por cada individuo evaluado a las nueve condiciones diferentes de exposición.

4.3.5 Embrioletalidad

Una vez que transcurrieron 96 horas de la exposición, los ovocitos de los sistemas anteriormente mencionados se observan nuevamente al microscopio

estereoscópico y se cuantifican aquellos coagulados y aquellos vivos. Posteriormente se realiza un análisis PROBIT con un intervalo de confianza del 95% para obtener la concentración letal media (CL50)

Grupo					
Individuo					
Características	Punto de corte				
	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Desarrollo de la cola					
Desarrollo ocular					
Formación de somitas					
Movimiento					
Latido de corazón					
circulación sanguínea					
Pigmentación cabeza-cuerpo					
Pigmentación de la cola					
Aparición de la aleta pectoral					
Protuberancia bucal					
Eclosión					
Total					
OBSERVACIONES					

Fig. 3 Formato de evaluación de las alteraciones al desarrollo embrionario y efecto teratogénico.

El índice teratogénico (IT) se calculó mediante la relación LC50/EC50. Si el IT era mayor de 1, el efluente se consideraba teratogénico y si era menor de 1 se consideraba embrioletal (Weigt *et al.*, 2011). Para garantizar la trazabilidad de los resultados, se establecieron dos criterios principales de validación de la prueba; el

primero fue para asegurar un porcentaje de fecundación $\geq 90\%$ y el segundo, para que la prueba se considerara válida, se realizó un análisis del grupo control en la marca de 96 hpf para revisar que no presentara un efecto teratogénico letal. índice superior al 10%.

4.3.6 Estrés oxidativo en embriones

Para la evaluación del estrés oxidativo en embriones, se colocaron aproximadamente 3g embriones en etapa de esfera (ver Fig. 2) por cada concentración evaluada incluyendo el control. A cada grupo se le asigna la concentración correspondiente de la concentración y se mantienen en exposición por 48 hpf, 72 hpf y 96 hpf y durante este periodo se mantuvo constante la temperatura ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) y los ciclos de luz/oscuridad (14 h:10 h). Una vez concluido cada tiempo de exposición se recolectaron de forma aleatoria 1g embriones y se homogeneizaron en 1 ml de buffer de fosfato (PBS, pH 7,4) utilizando un homogeneizador de rotor-estator (IKA T 10 básico ULTRA-TURRAX, EE. UU.). Las muestras se separaron en dos tubos Eppendorf. El tubo 1 contenía 300 μL del homogeneizado y 300 μL de una solución de ácido tricloroacético (TCA, 20 %). El tubo 2 contenía 700 μL del homogeneizado. Todos los tubos se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso.

El tubo 1 se centrifugó a 11495 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el pellet formado se usó para determinar el contenido de proteínas carboniladas (POx), mientras que el sobrenadante se utilizó para determinar el grado de lipoperoxidación (LPX) y el contenido de hidropéroxido (HPx). El tubo 2 se centrifugó a 12500 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad enzimática de: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y proteínas totales Ver Fig. 4.

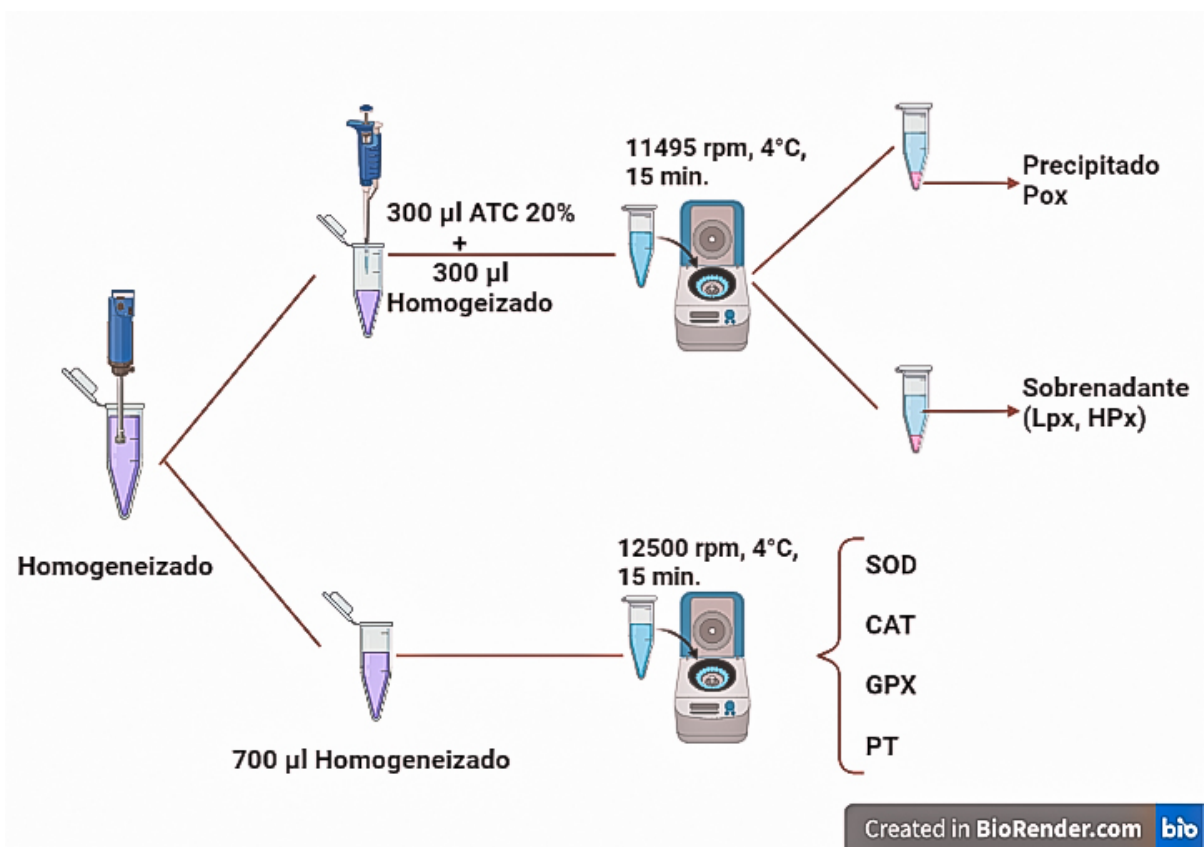


Fig. 4 Evaluación de estrés. Pox (proteínas carboniladas), LPx (lipoperoxidos), HPx (hidroperóxidos), SOD (superóxido dismutasa), CAT (catalasa), GPx (glutatión peroxidasa) y PT (proteínas totales)

4.3.7 Evaluación de Proteínas carboniladas

Al precipitado del tubo 1 agregamos 150 µL de dinitrofenilhidracina (DNPH)/ HCl 10 mM, se dejó reposar los tubos una hora en oscuridad y a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 500 µL de ATC al 20%, se dejó reposar los tubos 15 minutos a 4°C, para luego centrifugar durante 5 minutos a 11000 rpm, se desechó el sobrenadante, se lavó el botón con una solución de etanol:acetato de etilo 1:1 hasta obtener un botón blanco, se disuelve en 1 ml de Guanidina 6 M e incubaron los tubos a 37°C a 30 minutos, las absorbancias fueron leídas a 366 nm utilizando

un blanco con 200 μL de PBS que tuvo el mismo tratamiento que las muestras (Levine et al., 1994; Parvez y Raisuddin, 2005; Burchman, 2007).

4.3.8 Determinación del grado de lipoperoxidación

Nuevamente del tubo 1 se tomaron 50 μL de sobrenadante, se agregaron 450 μL de solución Tris-HCl 150 mM y 1 mL de solución TCA-TBA en tubos de vidrio. Fueron sumergidos en agua en ebullición para producir el choque térmico. Posteriormente se colocaron los tubos en la incubadora por 30 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se sacaron los tubos y se centrifugaron a 3500 rpm por 10 minutos. Se leyeron las absorbancias de las muestras a 535 nm contra un blanco que contenía buffer de fosfatos (PBS) 1.0 M pH 7.4 y el mismo tratamiento que las muestras (Buege y Aust, 1979)

4.3.9 Contenido de hidroperóxidos

Del tubo 1 se tomaron 100 μL de sobrenadante y agregaron 900 μL de la mezcla de reacción en un tubo eppendorf, se dejó reposar los tubos por 60 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz, pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 560 nm utilizando un blanco que tenga PBS y el mismo tratamiento que las muestras (Jiang et al., 1992).

4.3.10 Actividad enzimática de catalasa

Del tubo 2 se tomaron 30 μL de sobrenadante y colocaron directamente en la celda, se adicionaron 420 μL de buffer de aislamiento y 300 μL de una solución de peróxido de hidrógeno 20 mM, la absorbancia fue leída a 240 nm utilizando un blanco de PBS que tuvo el mismo tratamiento que las muestras (Radi et al., 1991).

4.3.11 Actividad enzimática de SOD

Fueron tomados 40 μL de sobrenadante del tubo 2 y colocados directamente en la celda, se adicionaron 260 μL de buffer de carbonatos y 200 μL de adrenalina 30 mM, la absorbancia fue leída a 480 nm utilizando un blanco de PBS que tuvo el mismo tratamiento que las muestras (Misra y Fridovich, 1972).

4.3.12 Actividad de glutatión peroxidasa

Del tubo 2 se tomaron 100 μL del sobrenadante y se colocó directamente en la celda, se adicionaron 290 μL de buffer de reacción, 100 μL de peróxido de hidrógeno 20mM y 12 μL de glutatión reductasa, la absorbancia fue leída a 340 nm utilizando un blanco de PBS que tuvo el mismo tratamiento que las muestras (Günzler y Flohé, 1985, modificado por Stephenson, 2000).

4.3.13 Determinación de proteínas totales

Se tomaron 13 μL de sobrenadante del tubo 2 y se colocaron en un tubo de plástico, se adicionaron 75 μL de agua destilada y 1.25 mL del reactivo de Bradford, los tubos fueron agitados para posteriormente dejarlos reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz, las absorbancias fueron leídas a 595 nm, utilizando un blanco de PBS que tuvo el mismo tratamiento que las muestras.

4.3.14 Validez del estudio y análisis estadístico

Los criterios usados para garantizar la trazabilidad de los resultados fueron los siguientes:

1. Los lotes de ovocitos eran aprobados solo si la tasa de fertilización era mayor al 90%.
2. La prueba se consideraba válida si los grupos del control no mostraban más del 10% de efectos teratogénicos letales a 96 hpf.

La CL50 y la CE50 de malformaciones se calcularon con el software US-EPA ver 1.5, mediante un análisis probit con regresión lineal de máxima verosimilitud. El índice teratogénico (IT) se calculó mediante la relación entre la CL50 y la CE50 de malformaciones. Para la evaluación del desarrollo embrionario (escala de puntuación de Hermsen), se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Los datos de los biomarcadores de estrés oxidativo se examinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, considerando el tiempo como factor A y la concentración como factor B. Las variaciones entre las medias se examinaron con el método de Student-Newman-Keuls, utilizando el software SigmaPlot 12.3.

4.4 Metodología para el estudio en adultos de *Danio rerio*

4.4.1 Exposición de adultos de *Danio rerio*

Para la exposición de los adultos de *Danio rerio* se dispusieron cuatro sistemas cada uno con 30 peces, en cada sistema se colocó 0.1, 2.5 y 3.5% respectivamente y el cuarto sistema fue el grupo control en el que no se adicionó el efluente, todos ellos con agua potable, de clorada, filtrada con carbón y esterilizada con rayos UV; temperatura constante (27°C) y ciclos de luz/obscuridad con una evaluación diaria de los parámetros de la calidad del agua, mencionados en la tabla 1.

Los tiempos de exposición fueron 12, 24, 48, 72 y 96 h para las pruebas de estrés oxidativo en cerebro, branquias, hígado e intestino. Con respecto a las pruebas de comportamiento, actividad de acetilcolinesterasa y expresión génica se expusieron

por 96 h. La prueba de toxicidad aguda semiestática se realizó de acuerdo con las directrices de la OCDE(N° 203).

4.4.2 Novel Tank Test

Posterior a 96 h de exposición se seleccionaron seis peces de forma individual al azar y se les introdujo en un tanque rectangular (cuyas medidas eran: 21.2 cm x 21.2 cm x 25.2 cm) con capacidad 15 L, durante 8 min (2min de aclimatación y 6 min de evaluación). El comportamiento de los peces fue grabado y posteriormente analizado con el software de seguimiento de movimiento Tox Track Ink. Se analizaron los siguientes parámetros de comportamiento de ansiedad:

1. La distancia total (cm) recorrida.
2. Distancia recorrida en la parte superior e inferior (cm)
3. Latencia para entrar en la parte superior (s).
4. Tiempo que permaneció en la parte superior e inferior (s).
5. La frecuencia de transiciones top>bottom, bottom>top
6. La duración de la congelación.

En esta prueba se evalúa la geotaxis, tigmotaxis, escototaxis, aumento de la congelación, y movimientos erráticos para determinar los niveles de ansiedad

4.4.3 Eutanasia y disección

La eutanasia y disección de los peces se realizó por un choque hipotérmico (2 oC – 4 oC) acorde a la directriz AVMA Guidelines on Euthanasia 2020 Edition. La muerte se determinó al examinar visualmente el cese completo del movimiento opercular (branquias) y la falta de respuesta a la estimulación táctil (American Veterinary Medical Association, 2020).

Los peces se colocaron sobre una charola, el pez debía de estar flexible, no congelado, y para la extracción de los órganos se hizo de la siguiente forma:

- Para la extracción del cerebro: se hizo un corte en la parte frontal de la cabeza con tijeras quirúrgicas para dejar expuesto el cerebro.
- Para la extracción de hígado e intestino: con la ayuda de tijeras quirúrgicas se abrió la cavidad abdominal y con el apoyo de unas pinzas se extrajo el hígado e intestino, cuidando el no dañar los órganos durante la manipulación.
- Para la extracción de las branquias: con la ayuda de unas pinzas y tijeras quirúrgicas cortamos el opérculo y dejamos expuestas las branquias para posteriormente cortarlas con las tijeras, cuidando no dañar el tejido

El pull de 10 órganos se introdujeron en un tubo eppendorf con 1.5 ml de solución buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4) y se almacenó a -80 °C hasta el análisis de la actividad de acetilcolinesterasa y la determinación de los biomarcadores de estrés oxidativo. Para el caso de expresión génica se siguió la misma metodología, pero la solución de almacenamiento es solución estabilizadora de tejidos proporcionada por Qiagen,

4.4.4 Actividad de acetilcolinesterasa

Los peces se colocaron en un baño de hielo, se removió cuidadosamente la parte superior del cráneo y los nervios craneales fueron cortados desde su origen para remover todo el cráneo. Se extirpo todo el cerebro y se peso, posteriormente se homogeneizo en 0.1M de buffer de fosfatos pH 8 (20 mg de tejido cerebral /ml de buffer). Posteriormente al homogeneizado se centrifugo con microcentrifuga refrigerada a 4° C por 15 min a 10000 x g y el sobrenadante se extrajo para la determinación de acetilcolinesterasa.

La actividad enzimática fue determinada inmediatamente por triplicado con base al método colorimétrico de Ellman et al., (1961). Se utilizó acetilcolina yodada (ACTh)

con 5,5 –dithiobis-2-nitrobenzoate (DTNB) como indicador de tiol. La mezcla de reacción contiene 2.6 mL de buffer de fosfatos (pH 8.0, 0.1M) 0.1 mL DTNB (0.01 M en 0.1M de buffer de fosfatos pH 7, 15 mg de bicarbonato de sodio por cada 10 mL de solución) con la adición de 400 µL de sobrenadante.

4.4.5 Estrés oxidativo en adultos de *Danio rerio*

Una vez transcurrido el tiempo (12, 24, 48 y 72h) de los cuatro sistemas de peces expuestos a las tres concentraciones de efluente y el control antes mencionados, los peces fueron sacrificados con el método de shock hipotérmico

Empleando un Ultra-turrax T25 (IKA, Alemania), las muestras de cerebro se homogeneizaron y luego se distribuyeron en dos tubos Eppendorf. El tubo 2 comprendía solo 700 µL del homogeneizado y el tubo 1 abarcaba 300 µL de muestra y 300 µL de TCA. Los tubos 1 y 2 se centrifugaron a 11 495 y 12 500 rpm, y el contenido se utilizó para evaluar todos los biomarcadores de estrés oxidativo (Fig.4).

El grado de LPX se evaluó con el método reportado por Buege y Aust, (1978). Los resultados se expresan como nM de malondialdehído, obtenidos por la concentración ambiental medida de 1,56x10⁵/M/cm por mg de proteína por g de tejido.

El PCC se determinó por el método descrito por Levine et al., 1994, con algunas modificaciones. Los resultados se expresan como nM de carbonilos reactivos, obtenidos por las concentraciones ambientales medidas de 21, 000/M/cm por mg de proteína por g de tejido.

El HPC se cuantificó por el método de Jian et al., 1992 y los resultados se expresan como nM de cumeno por mg de proteína por g de tejido.

La actividad SOD se estableció por el método de Misra y Fridovich, 1972 y los resultados se expresan como U SOD por mg de proteína por g de tejido

La actividad de la CAT se estimó por el método de Radi et al., 1991 y los resultados se expresan como mM de H₂O₂ por mg de proteína por g de tejido.

La actividad de GPx se midió por el método de Gunzler y Flohe-Clairborne, 1985 y los resultados se expresan como U/L de GPx por mg de proteína por g de tejido.

Todos los resultados de los biomarcadores se normalizaron con respecto a las proteínas totales, que se midieron por el método de Bradford, 1976. Además, los experimentos se repitieron tres veces.

4.4.6 Evaluación de la expresión génica

4.4.6.1 Extracción de RNA

Los cuatro grupos evaluados en adultos (0.1%, 2.5%, 3.5% y grupo control) se expusieron al efluente por 96 h, una vez transcurrido este tiempo, se realizó la eutanasia y subsecuente extracción de los órganos con base en lo especificado en el punto 5.4.3 Eutanasia y disección. El pull de órganos de cada grupo de estudio se colocó en solución estabilizadora RNAlater® y se almacenaron a -20°C hasta la extracción del RNA.

Todas las soluciones para la extracción y obtención de cDNA son de la marca Qiagen®. Las muestras de los cuatro órganos (cerebro, branquias, intestino e hígado) de los cuatro grupos de estudio (0.1%, 2.5%, 3.5% y control) que se almacenaron en solución RNAlater® se descongelaron en baño de hielo para posteriormente transferirlos a 600µl del buffer RTI que viene en el kit RNAeasy de Qiagen®, todas las muestras se homogeneizaron por 40 seg. Posteriormente se centrifugó el lisado durante 3 minutos a máxima velocidad, se retiró el sobrenadante con pipeta y se transfirió a un nuevo tubo. A este sobrenadante del lisado se agregó un volumen de etanol al 70% se mezcló por pipeteo. Para luego transferir 700µl de la muestra a una columna de centrifugación RNAeasy®, se centrifugó por 15 seg a 8 000g y se descartó el flujo continuo.

Posteriormente se adicionaron 700µl de buffer RWI, contenido en el mismo kit, a la columna y se centrifugó por 15 segundos a 8 000g, de igual forma se desechó el flujo continuo. Se adicionó a este tubo 500µl del buffer RPE a la columna y se centrifugaron 15 segundos a 8 000g para lavar la membrana del centrifugado, de igual forma se desechó el flujo continuo.

En seguida se adicionaron 500µl de buffer RPE a la columna, centrifugar 2 min a 8 000g para lavar nuevamente la columna del centrifugado.

Por último, colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recogida. Añadir 30µl de agua libre de RNAsas directamente a la membrana, centrifugar por 1 min a 8 000g para eluir el RNA. Se evaluó la calidad del RNA en el equipo nanodrop mediante la lectura de las absorbancias a 230nm, 260nm y 280nm. Se determinó la calidad mediante las relaciones 260/280 y 260/230 solo se consideraron muestras de buena calidad aquellas con valores alrededor de 2. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso.

4.4.6.2 *Transcripción reversa*

Las muestras de RNA se descongelaron en baño de hielo, se mezclaron en un tubo eppendorf los componentes de la Tabla 2. marcados con el superíndice “a” y se incuban por 2 min a 42°C, y llevar a hielo inmediatamente, para posteriormente adicionar los reactivos marcados con el superíndice “b”. Se mezcló perfectamente y se mantuvo en hilo, se incubó por 15 min a 42°C y por último 3 min a 95°C para inactivar la transcripción reversa.

Tabla 2 Componentes de reacción de transcripción reversa

Componente	Volumen de reacción
gDNA Wipeout Buffer 7X ^a	2µl
Template RNA a	10µl
RNAase free wáter ^a	2µl
Quantiscript reverse transcriptase ^b	1 µl
Quantiscript RT Buffer 5X ^b	4 µl
RT Primer Mix ^b	1 µl
Volumen Total	20 µl

4.4.6.3 *Diseño de primers*

La expresión de los genes *sod*, *cat*, *gpx*, *nrf1a* y *nrf1b* se evaluó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los pares de primers se diseñaron en Primer3 y BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> usando las secuencias nucleotídicas disponibles en el GeneBank. Estas secuencias, las longitudes de los amplicones, temperatura de annealing y los números de acceso de los genes estudiados, se reportan en la Tabla 3.

4.4.6.4 *Reacción de PCR*

La reacción de PCR se realizó con 25µl de reactivo 2X Quantitec SybrGreen, de cada primer se adicionó 1µl, del templado se adicionaron 4µl, de agua libre de RNAsas 19µl, el volumen total de la reacción fueron 50µl. Se mezclaron bien todos los reactivos para cada muestra para realizar los ciclos de PCR establecidos en la Tabla 4. y con los ciclos establecidos en la Fig. 5

Tabla 3 Secuencias de primers, temperaturas de annealing y tamaño del producto en pares de bases (pb).

Gen y número de acceso	Secuencias de primers	Temp. de Annealing (°C)	Tamaño del producto (pb)
sod	F: 5'ACCGGCACCGTCTATTTCAA3'	59.68	105
NM_131294.1	R: 5'AGCATGGACGTGGAAACCAT3'	59.96	
cat	F: 5'CTCCTGATGTGGCCCGATAC3'	59.97	521
NM_130912.2	F: 5'GCCCCCATTGCTTGAAGG3'	60.04	
gpx	F: 5'AGCATGGCAGGAACCATGAA3'	59.96	291
NM_001007281	F: 5'GAAGCCATTTCCAGGACGGA3'	60.04	
nrf1a	F: 5'CAGTGACAGTAGCCCAGGTG3'	60.04	111
NM_001328540.1	R: 5'CTGACGCTTGTGTGGTTTGG3'	59.97	
nrf2a	F: 5'GGCGATCCTCCTGTAAACCC3'	60.18	173
NM_182889.1	R: 5'CCGAAGGATCCGTCTTCGGT3'	61.66	
act1	F: 5' ACCACGGCCGAAAGAGAAAT	59.96	263
NM_131031	R: 5' ATGTCCACGTCGCACTTCAT3'	60.04	

Tabla 4. Condiciones para la PCR

Etapa	Tiempo	Temperatura
Activación inicial	15 min	95°C
Desnaturalización	15 seg	94°C
Annealing	30 seg	60°C
Extensión	30 seg	72°C

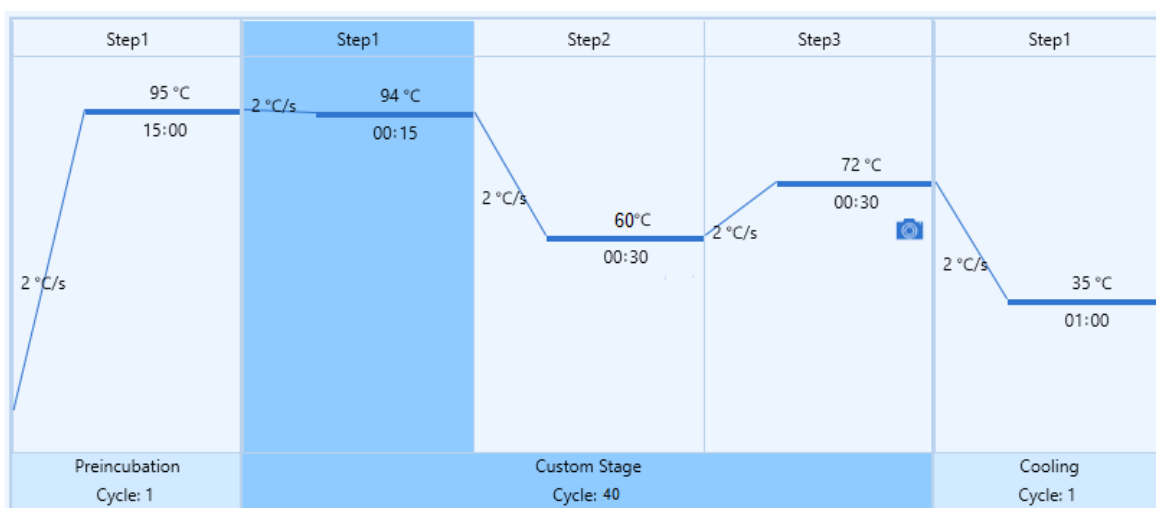


Fig. 5 Diagrama de los ciclos de PCR tiempo real en el termociclador.

Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado para todas las muestras y como control negativo se usaron muestras a las cuales no se adicionó el cDNA y en su lugar se colocó agua libre de RNAsas. Los datos fueron analizados mediante el método doble delta ct (Livak and Schmittgen, 2001). Los datos fueron normalizados usando como gen de referencia el gen de actina.

4.4.6.5 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media (mediana) \pm SEM (error estándar de la media). Los análisis estadísticos de la expresión de ARNm se realizaron utilizando el software Graphpad Prism 4. Los datos se probaron para los criterios de normalidad utilizando Kolmogorov-Smirnov. Si los datos se distribuyeron normalmente, los efectos del efluente en los niveles de expresión génica se determinaron mediante la prueba de homogeneidad de la varianza entre los grupos, un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y las diferencias entre los grupos de prueba se evaluaron con la prueba de Tukey. Para datos que no se distribuyen normalmente, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn. En nuestro experimento, la diferencia entre los grupos se evaluó como significativa en $P < 0,05$ (*) y altamente significativa en $P < 0,01$ (**).

4.5 Aprobación ética.

El presente protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex) para garantizar que los experimentos se realicen de acuerdo con las normas institucionales para el cuidado de los animales (ID de aprobación: RP.UAEM.ERC.145.2020).

5 RESULTADOS

5.1 Resultados de la caracterización fisicoquímica y cuantificación de contaminantes.

Los parámetros tomados como referencia para la caracterización fisicoquímica del efluente son los establecidos en la normatividad mexicana, como se indica en la Tabla 6. La demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno, cloruros y sólidos totales suspendidos están por arriba de los límites indicados en la

normatividad; para conductividad electrolítica, oxígeno disuelto, amoníaco, y NaClO no tenemos límites establecidos por la normatividad mexicana. Respecto al oxígeno disuelto no hay parámetro especificado, sin embargo, usamos como rango de referencia 7 – 8 mg/L (Roldan, 2003)

Lo que respecta a la identificación y cuantificación de microcontaminantes que pudieran estar presentes en el efluente hospitalario, encontramos diversas sustancias químicas (Tabla 7.), entre ellas metales, NSAIDs, corticoesteroides, fármacos inhibidores de la bomba de protones y H2 antagonistas. Los metales que se encuentran fuera de los límites permitidos por la normatividad mexicana son mercurio y plomo, los cuales se marcaron con * en la Tabla 7 los fármacos más abundantes detectados son pertenecientes a la familia de los NSAIDs, ketorolaco es el que encabeza la lista con mayor abundancia

Tabla 5 Caracterización fisicoquímica del efluente hospitalario

Parámetro fisicoquímico	Valores del efluente	NOM-001-SEMARNAT-2021	NOM-002-SEMARNAT-1996
Demanda bioquímica de oxígeno (mg L ⁻¹)	91.4 ± 1.6	60	40 - 60
Demanda química de oxígeno (mg L ⁻¹)	173.6 ± 2.8	100	NE
Conductividad electrolítica (µS cm ⁻¹)	2031.7 ± 10.6	NE	NE
pH	6.4 ± 0.1	6 - 9	6 - 10
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	8.1 ± 0.9	NE	NE
Temperatura (°C)	22 ± 1	35	40
Cloruros (mg L ⁻¹)	268.9 ± 4,2	250	NE
Fluoruros (mg L ⁻¹)	12.1± 0.7	0-15	NE

Dureza (mg L ⁻¹)	145.6 ± 3.6	500	NE
Amonio (mg L ⁻¹)	2.1 ± 0.4	NE	NE
Sólidos suspendidos totales (mg L ⁻¹)	75.6 ± 2.6	40	40-60
Fósforos totales (mg L ⁻¹)	6.7 ± 0.2	10	10
Nitrógeno total (mg L ⁻¹)	19.3 ± 1.8	25	NE
NaClO (mg L ⁻¹)	5.2 ± 0.8	NE	NE

NE = no establecido en la norma. Los datos representan el promedio ± desviación estándar de tres experimentos diferentes independientes.

Tabla 6 Microcontaminantes identificados en el efluente hospitalario

Tipo de contaminante	Metal o fármaco	Concentración
Metal	As (mg L ⁻¹)	0.21 ± 0.07*
	Cd (mg L ⁻¹)	0.38 ± 0.04*
	Cu (mg L ⁻¹)	0.52 ± 0.05
	Cr (mg L ⁻¹)	0.91 ± 0.08
	Hg (mg L ⁻¹)	1.3 ± 0.05 *
	Ni (mg L ⁻¹)	1.5 ± 0.03
	Pb (mg L ⁻¹)	2.5 ± 0.02*
	Zn (mg L ⁻¹)	1.2 ± 0.09
AINES	Ketorolaco (ng L ⁻¹)	1671.20 ± 4.3
	Ibuprofeno (ng L ⁻¹)	39.80 ± 1.7
	Naproxeno (ng L ⁻¹)	198.5 ± 3.1
	Paracetamol (ng L ⁻¹)	82.6 ± 2.9
Corticosteroides	Dexametasona (ng L ⁻¹)	43.2 ± 0.73
	Hidrocortisona (ng L ⁻¹)	< 10
Inhibidor de la bomba de protones	Esomeprazol (ng L ⁻¹)	< 10
	Omeprazol (ng L ⁻¹)	< 10

Antagonistas H2	Ranitidina (ng L ⁻¹)	19.2 ± 0.87
-----------------	----------------------------------	-------------

Los datos se representan como el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes. El * indica aquellos datos que exceden los valores establecidos por la normatividad mexicana

5.2 Resultados de embriotoxicidad y teratogenicidad

El porcentaje de embriones muertos aumento de forma dependiente de la concentración. En la Tabla 8. se muestra el porcentaje de mortalidad y de malformaciones a las ocho diferentes concentraciones de exposición. Con esta información se determinó la concentración letal 50 (LC50) de 2.328% con intervalos de confianza del 95% de 1.830 - 3.149 y la concentración efectiva 50 de malformaciones (EC50) de 2.607% con intervalos de confianza del 95% de 2.035 – 3.707. Con estos valores pudimos determinar el índice teratogénico (IT) el cual fue de 0.893, con base en lo que indica Weigt et al., 2011 el efluente hospitalario estudiado es embrioletal. (Weigt *et al.*, 2011).

Es importante señalar que a las 12hpf ya se observaban embriones muertos, sin embargo, la mayoría de los embriones que murieron a los 3dpf los cuales presentaron diversas anomalías, como retraso en el crecimiento, edema de saco vitelino, edema pericárdico, escoliosis y retraso en el desarrollo (Fig. 6). Los peces del grupo control se desarrollan de forma normal.

En este estudio se realizó un seguimiento de la mortalidad relacionada a la concentración de exposición, esto se muestra en el gráfico de Kaplan-Meier (Fig. 7.) entre dichas curvas existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) y la probabilidad de muerte es concentración dependiente, lo que puede observarse en la Fig. 7, existe una caída mayor en la última concentración evaluada (4.0%).

La evaluación de cada malformación se hizo con base en los criterios de Hermsen *et al.*, 2011 y Kimmel *et al.*, 1995. En la Fig. 8 se puede observar la puntuación de la morfología y a diferencia del control, los embriones expuestos al efluente disminuyeron significativamente la puntuación. Se observa una interacción estadísticamente significativa entre el tiempo y la concentración de exposición ($P < 0.001$)

Tabla 7 Datos de mortalidad y malformación en *Danio rerio* por exposición al efluente hospitalario.

Proporción del efluente	Embriones expuestos	Mortalidad (%)	Malformaciones (%)
Control	72	1.4	0.0
0.5%	72	31.9	31.9
1.0%	72	34.7	31.9
1.5%	72	36.1	34.7
2.0%	72	37.5	37.5
2.5%	72	50.0	45.8
3.0%	72	52.8	48.6
3.5%	72	62.5	61.1
4.0%	72	66.7	66.7
		CL50 = 2.328%	EC50 = 2.607%
		IC = [1.830% - 3.149%]	IC = [2.035% - 3.707%]
Índice teratogénico: 0.893			



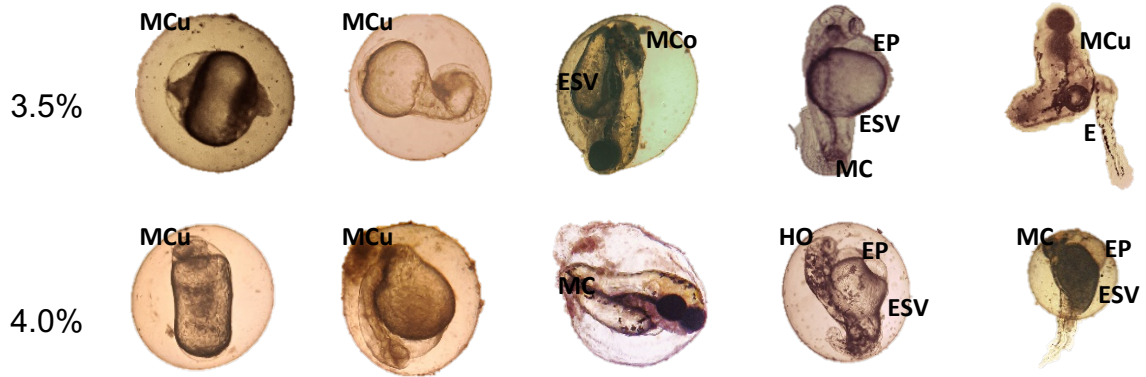


Fig. 6 Características morfológicas de los embriones después de la exposición
 ESV: edema de saco vitelino, MCo: Malformación de cola, EP: edema pericárdico,
 E: escoliosis, MC: malformación craneofacial, HO: hipopigmentación de ojo, RD:
 retraso en el desarrollo, MCu: malformación de cuerpo.

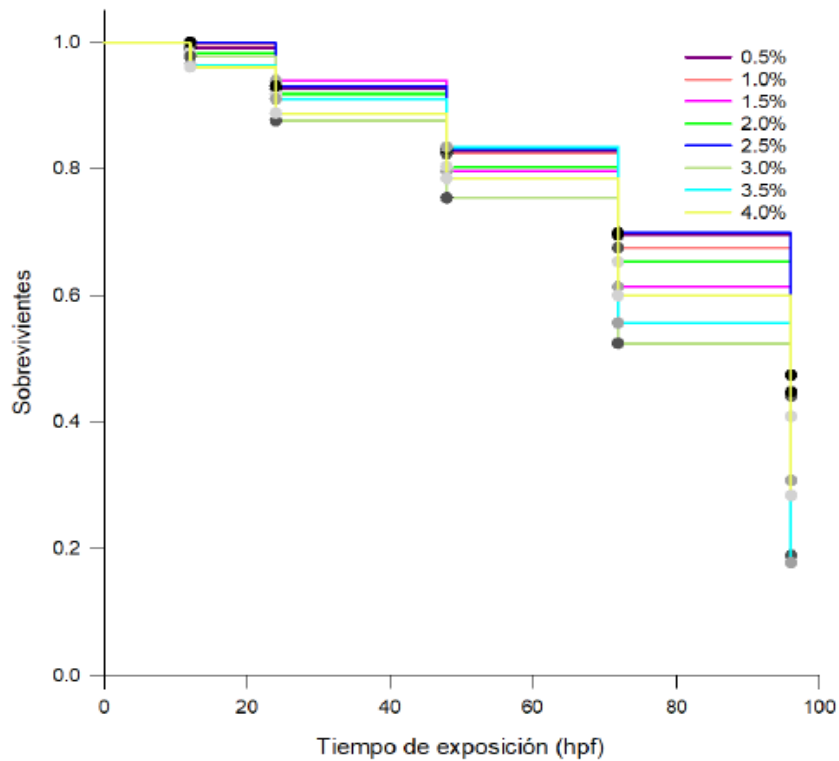


Fig. 7 Gráfica de Kaplan – Meier. La estadística de rango logarítmico para las curvas de supervivencia es mayor de lo que se esperaba por casualidad; existe una

diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de supervivencia ($P = <0,001$).

Para aislar el grupo o grupos que difieren de los demás utilice un procedimiento de comparación múltiple

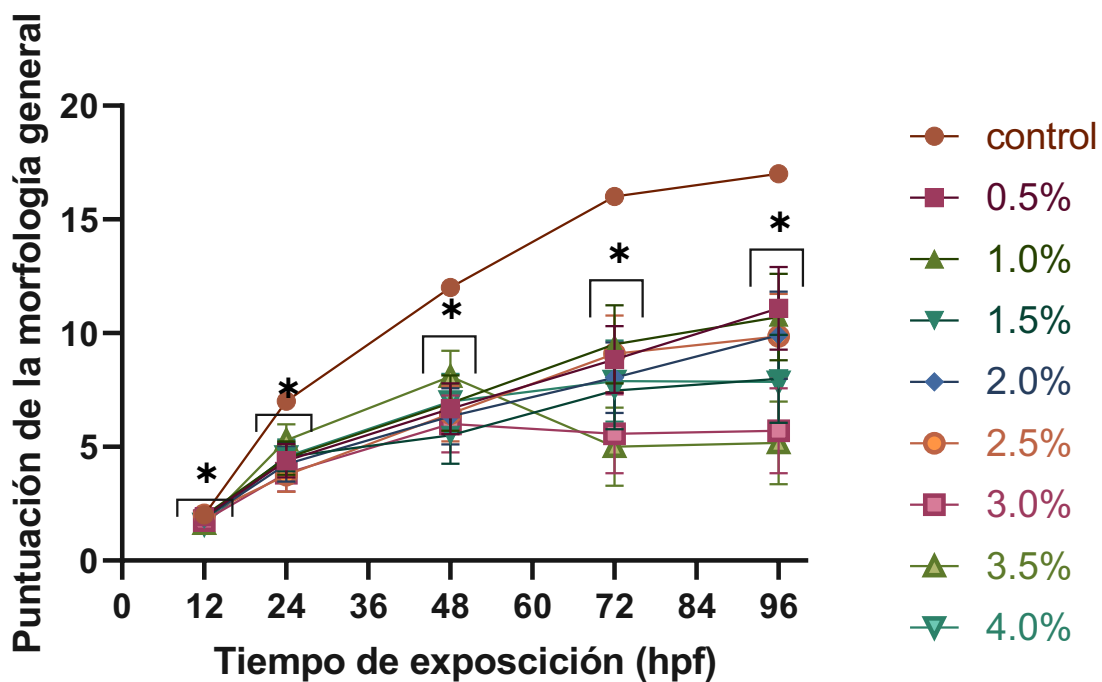
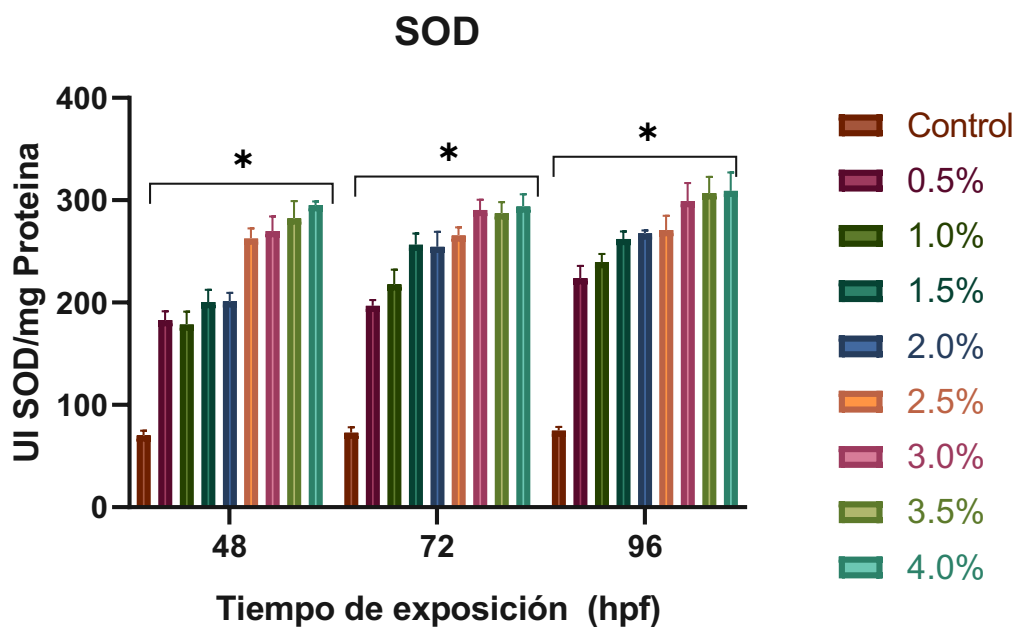


Fig. 8 Puntuaciones de la morfología de *Danio rerio* en respuesta por exposición al efluente hospitalario Los datos son expresados en promedios con el 95% de intervalo de confianza, de tres experimentos diferentes. ($P < 0.001$). Las ocho concentraciones diferentes de exposición muestran diferencia significativa con respecto al control.

5.3 Actividad antioxidante inducida por el efluente en embriones

La actividad antioxidante de las enzimas evaluadas se muestra en la Fig. 9. se puede observar la actividad antioxidante en todos los grupos de exposición y todos ellos mostraron un aumento significativo con respecto al control.

En estas enzimas en todos los grupos de exposición, muestran un aumento significativo en comparación con el control. El análisis estadístico los niveles de SOD ($F(16,9)=3.419$; $P<0.0001$), CAT ($F(16,9)=14.53$; $P<0.0001$), fueron significativamente diferentes entre las concentraciones evaluadas.



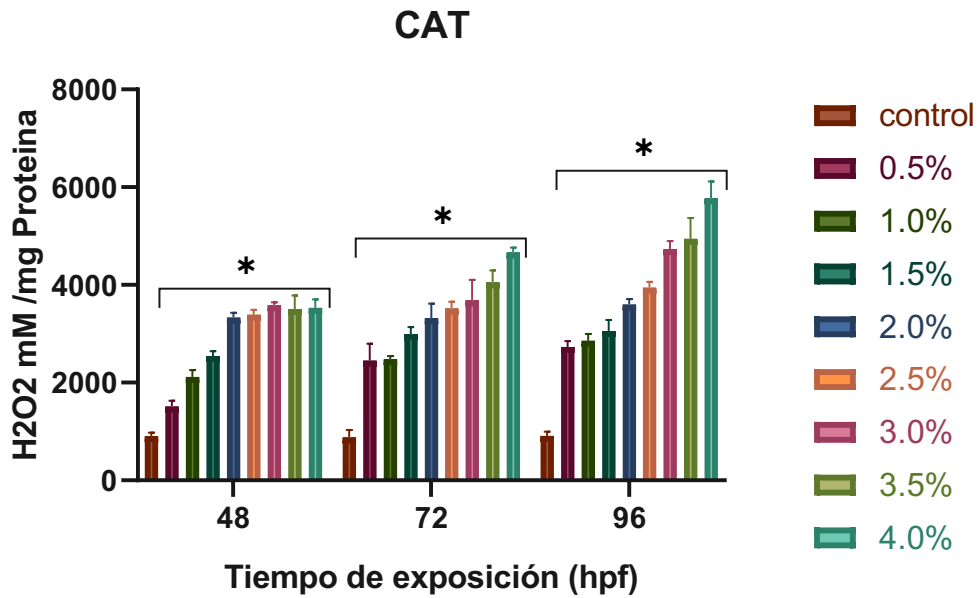
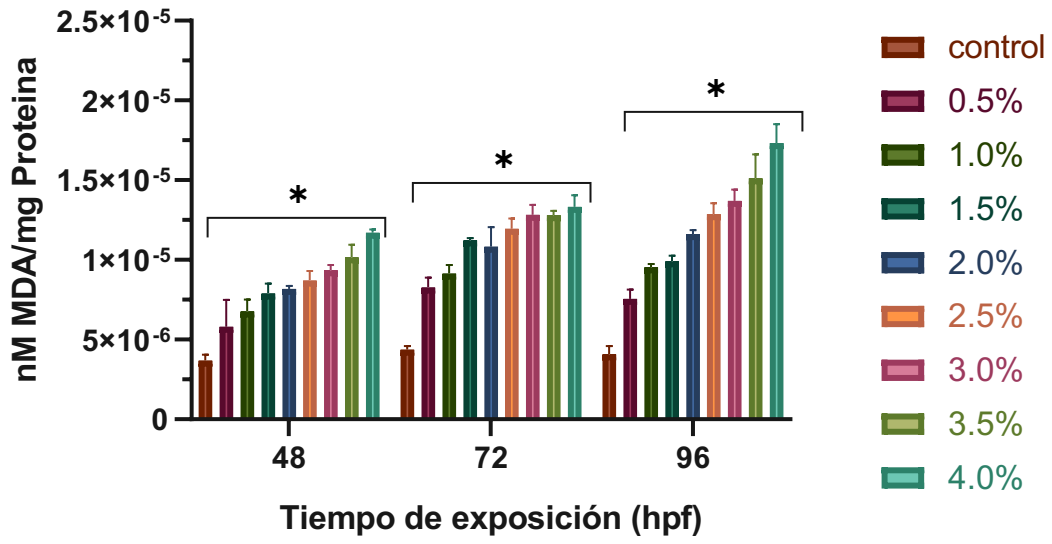


Fig. 9 Actividad de SOD y CAT en embriones de *Danio rerio* expuestos al efluente hospitalario por 48, 72 y 96hpf. Las estadísticas se expresan como la mediana de tres replicas independientes con el rango intercuartil. El * indica significancia relativa con respecto al grupo control. $p < 0.05$

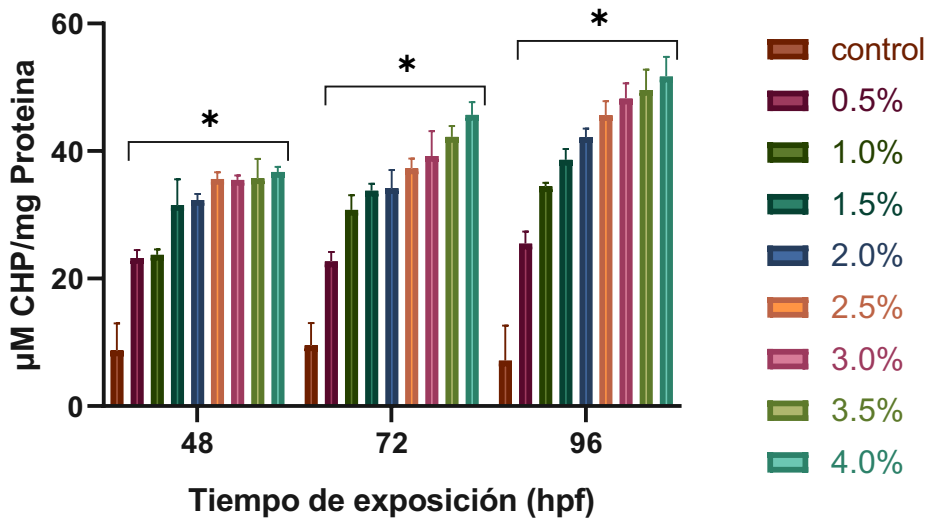
5.4 Daño oxidativo inducido por el efluente hospitalario en embriones

Los niveles de todos los biomarcadores de daño oxidativo en los ocho grupos de tratamiento mostraron un aumento significativo en relación con el grupo control. En todos los casos y con todos los biomarcadores los niveles de todos ellos mostraron una diferencia significativa con respecto al control. Los niveles de LPx, POX y HPX en embriones de *Danio rerio* expuestos al efluente se muestran en la Fig. 10

LPX



HPx



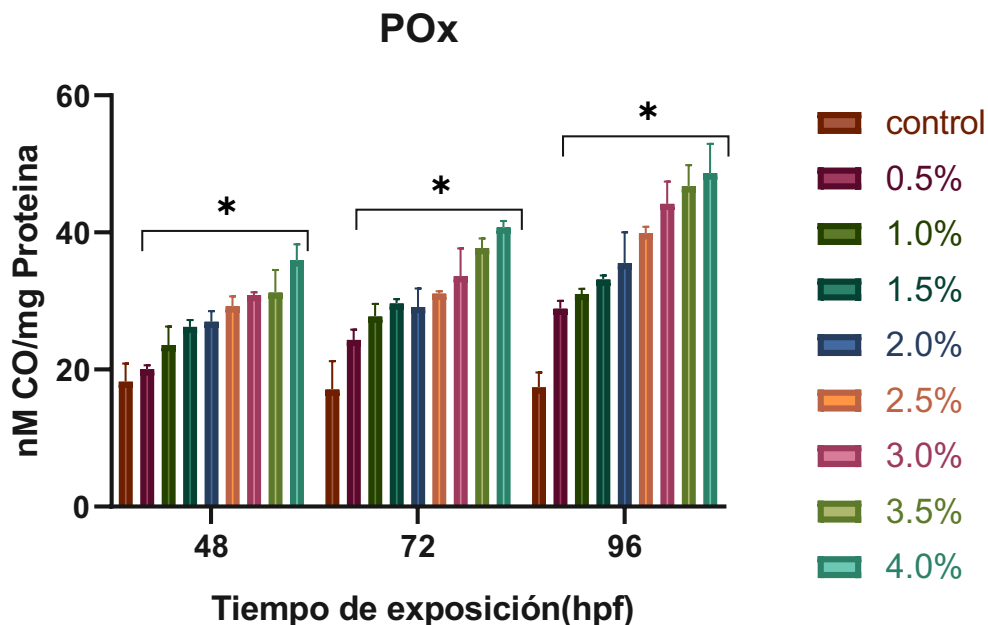
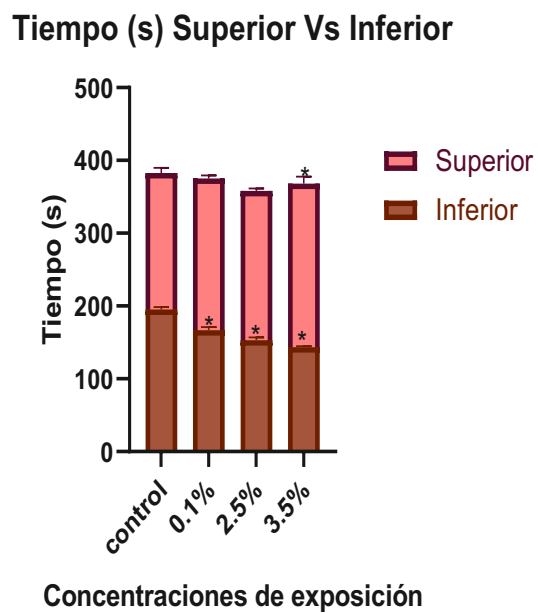
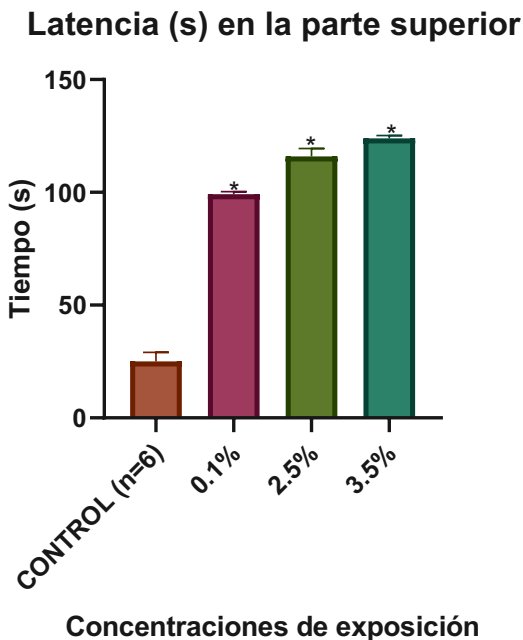
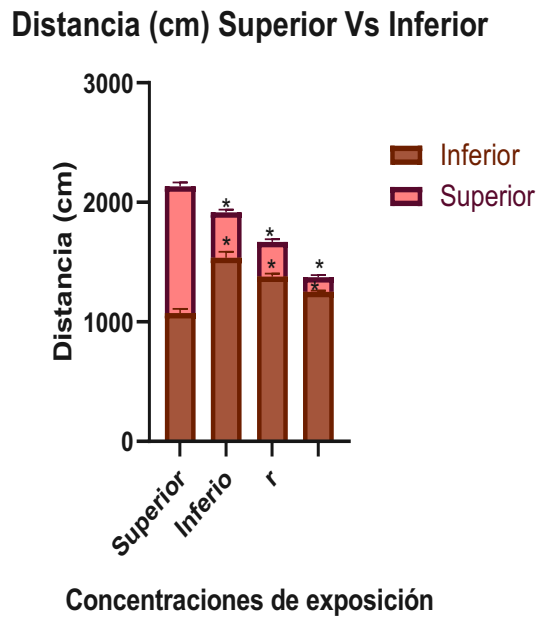
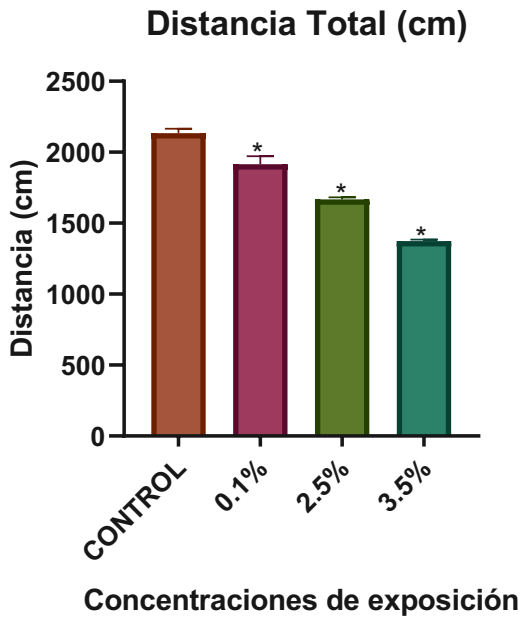


Fig. 10 Niveles de LPx, HPx, y POx en embriones de *Danio rerio* expuestos al efluente hospitalario a 48, 72 y 96hpf. Los datos estadísticos se expresan como la media de tres réplicas con el rango intercuartil. Los datos estadísticos se expresan como el promedio de tres replicas con el rango intercuartil El * indica una relación significativa en relación con el grupo control.

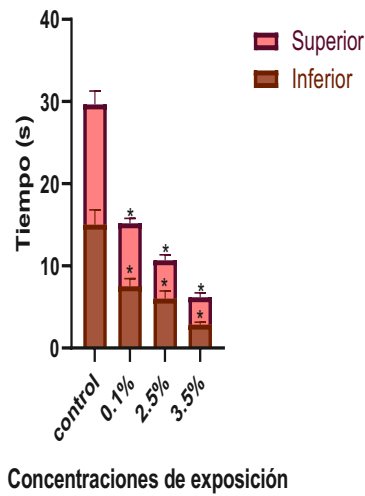
5.5 Resultados de comportamiento de adultos de *Danio rerio* por exposición al efluente hospitalario

El comportamiento en el pez cebra se realizó mediante la prueba Novel Tank, en dicho estudio se evaluó: la distancia total recorrida, la distancia superior Vs inferior, tiempo superior Vs inferior, la latencia en la parte superior, la frecuencia de transiciones, la duración del congelamiento (Fig. 11). Como resultado se observa una disminución de la distancia total recorrida en la cual se considera tanto la distancia recorrida en la parte superior como la inferior, efecto presente cuando el pez tiene una disminución de su conducta exploratoria.

Se puede observar que el tiempo de latencia en la parte superior es mayor y por ende menor número de transiciones, lo que va en concordancia con la duración de los episodios de congelamiento los cuales también aumentan conforme aumenta la concentración de exposición. Este comportamiento pone de manifiesto que el pez tiene ansiedad y estrés consecuencia de la exposición al efluente hospitalario.



Frecuencia de transiciones (s) Superior Vs Inferior



Duración del congelamiento (s) Superior Vs Inferior

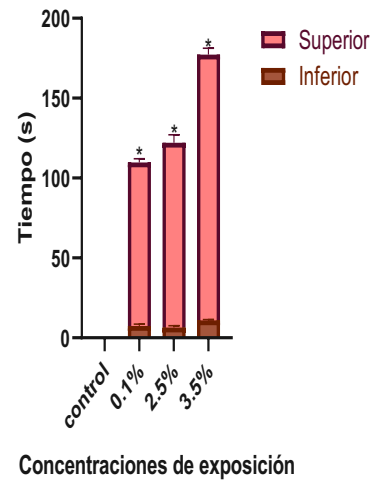


Fig. 11 Cambios de comportamiento observados en *Danio rerio* expuestos a 0.1, 2.5 y 3.5% de efluente hospitalario. Los valores son la media de cada experimento realizado por triplicado \pm SEM. *Diferencias significativas en relación con el grupo control: ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

5.6 Niveles de Acetilcolinesterasa en cerebro de *Danio rerio*

Se evaluaron los niveles de acetilcolinesterasa en cerebro de *Danio rerio*, posterior a su evaluación de comportamiento. Los resultados se muestran en la Fig. 12. Los resultados muestran que hay una disminución de esta enzima conforme aumenta la concentración de la exposición.

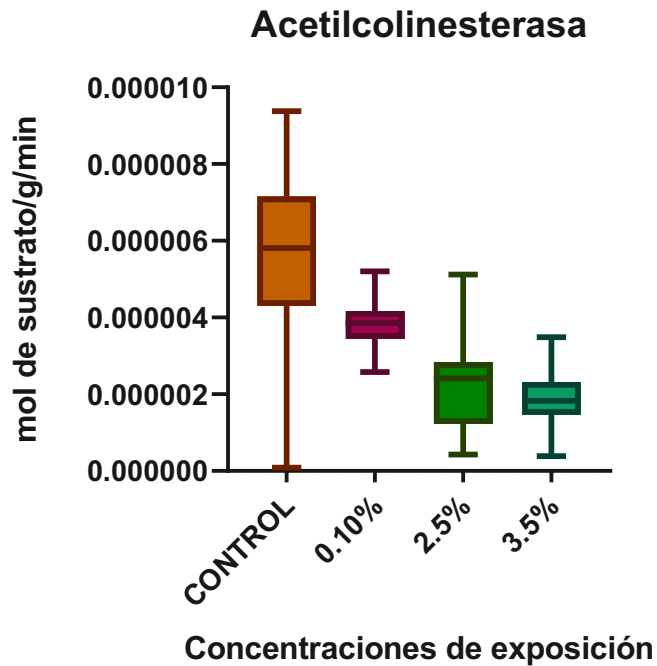


Fig. 12 Actividad de acetilcolinesterasa en cerebros de *Danio rerio*.

5.7 Resultados de actividad antioxidante en adultos de *Danio rerio*

Se evaluó la actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX en cuatro órganos (cerebro, branquias, hígado e intestino) del pez cebra. En la Fig. 13, Fig. 14, Fig. 15 y Fig16 se muestra la respuesta antioxidante en cerebro, branquias, hígado e intestino respectivamente. En cerebro CAT mostró un aumento significativo a las 72 horas de exposición a las tres concentraciones en comparación con el control. En el caso de las branquias e hígado, las tres enzimas mostraron un aumento de la actividad desde las 12 horas de exposición. En el caso del intestino CAT y GPX mostraron un aumento de la actividad a partir de las 12 horas de exposición.

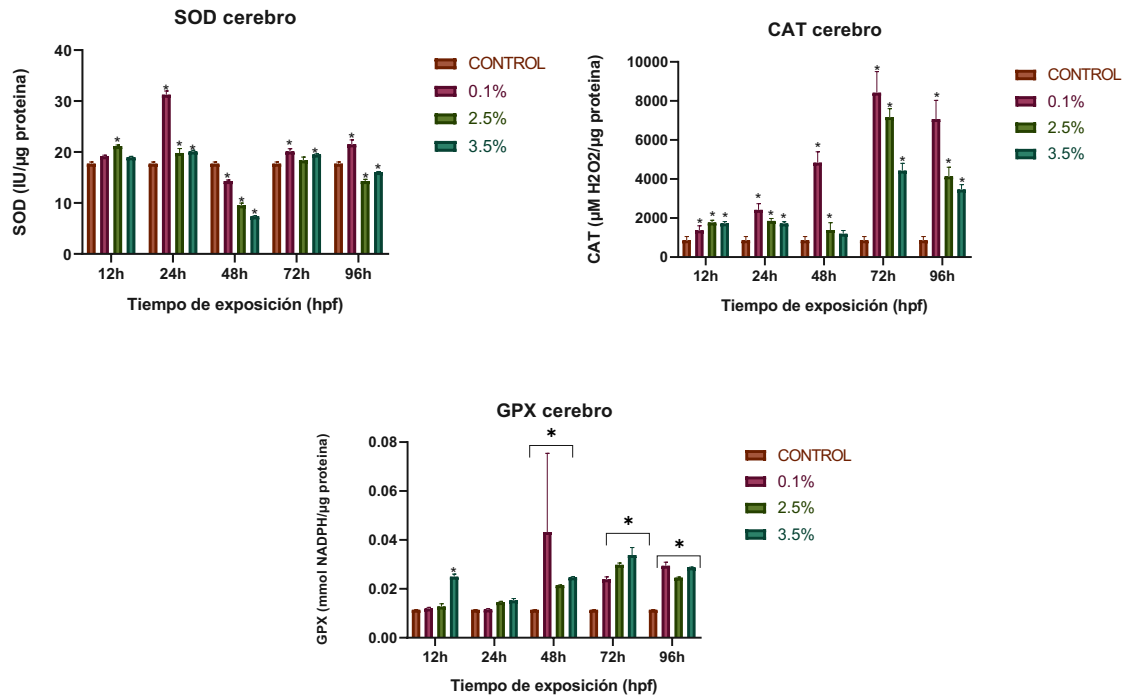


Fig. 13 Actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX en cerebro

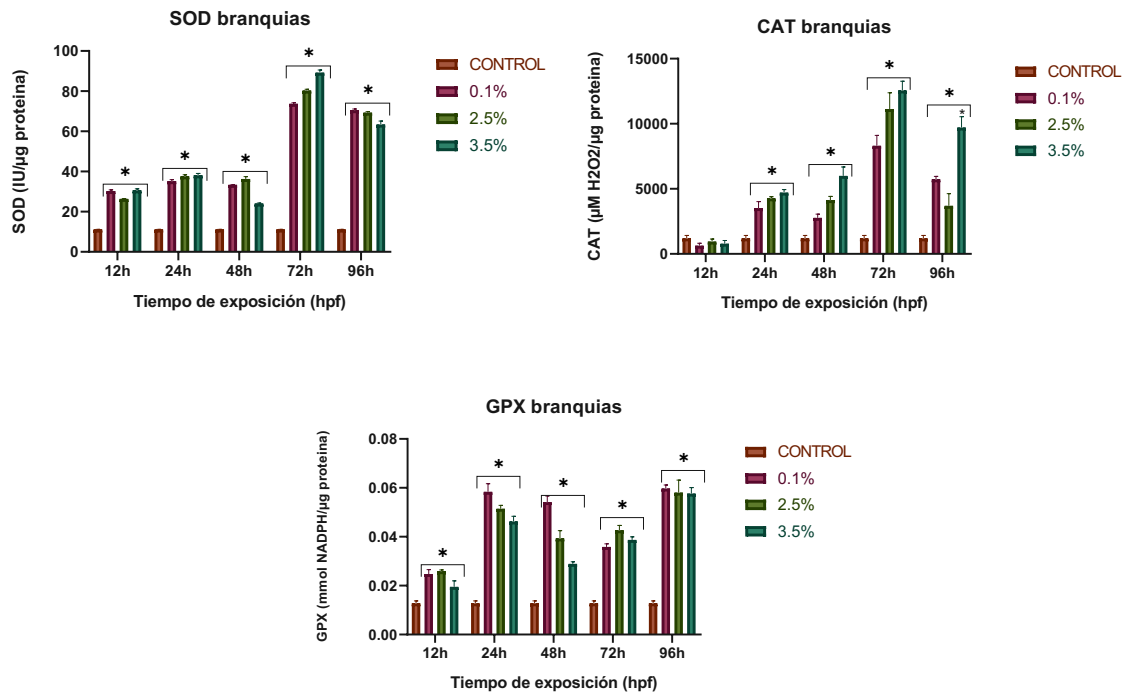


Fig. 14 Actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX en branquias

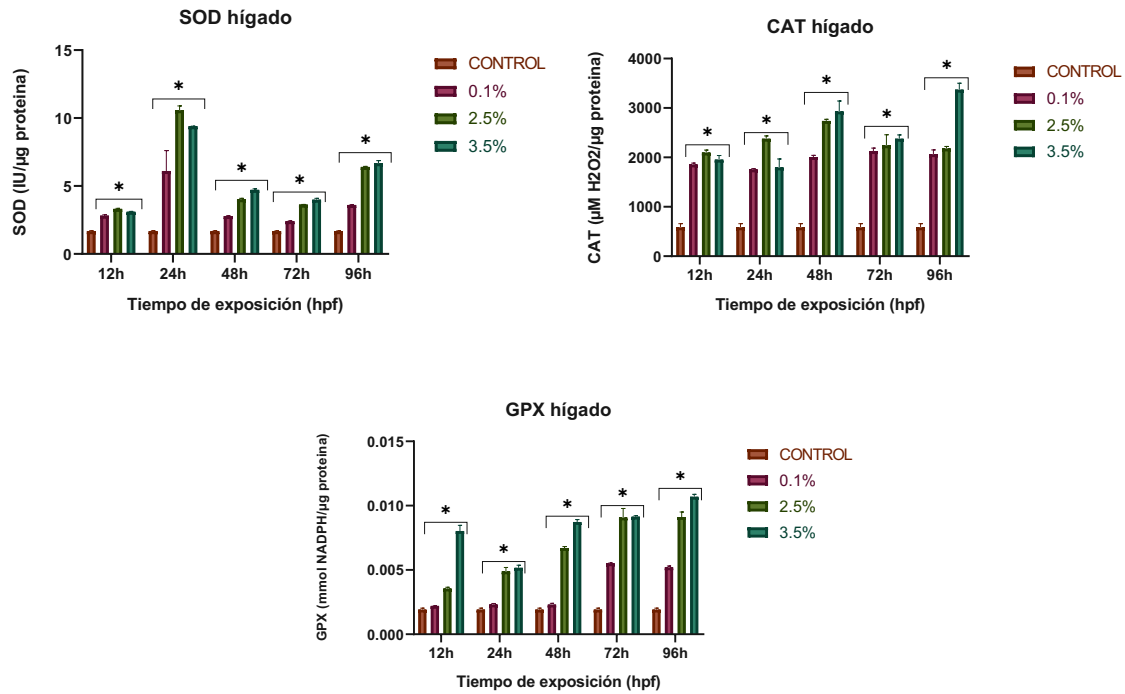


Fig. 15 Actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX en hígado

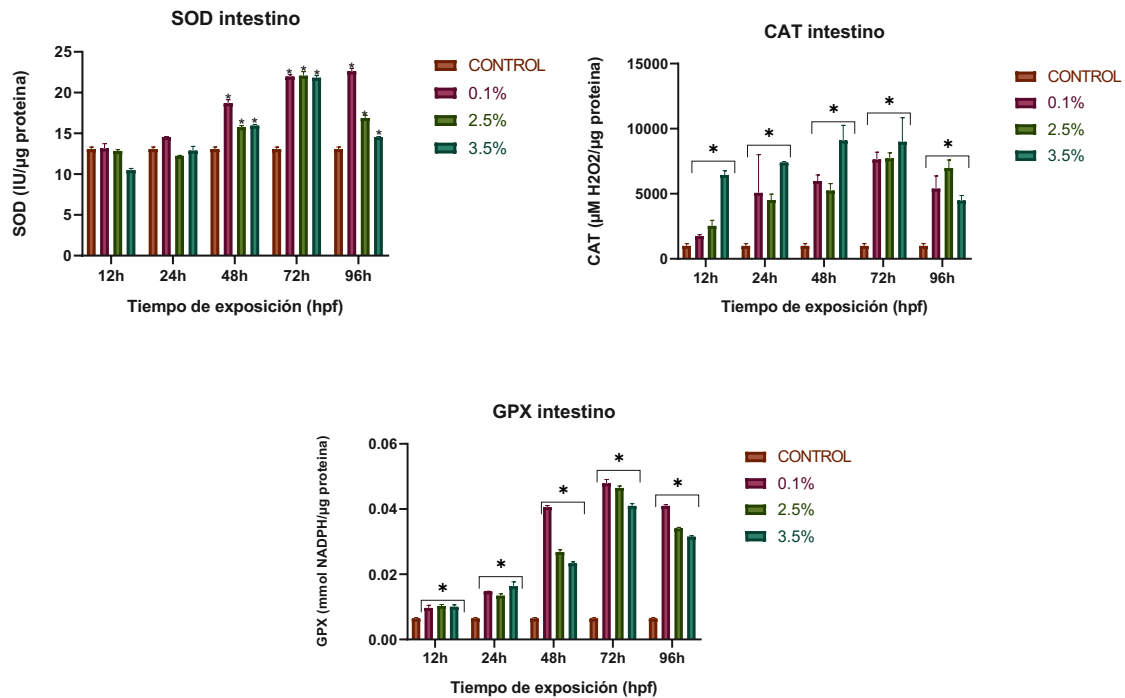


Fig. 16 Actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX en intestino.

5.8 Resultados de oxidación celular en *Danio rerio*

Los niveles de LPX, POX y HPX en adultos de *Danio rerio* expuestos al efluente hospitalario en cerebro, branquias, hígado e intestino se muestran en la Fig. 17, Fig.18, Fig. 19 y Fig. 20. En cerebro, estos tres biomarcadores mostraron un aumento significativo con respecto al control, a partir de las 12 h de exposición. HPC en el caso de las branquias incremento significativamente con respecto al control en las tres concentraciones desde las 12h de exposición. En hígado e intestino se observó un aumento significativo con respecto al control para MDA, PCC y HPC.

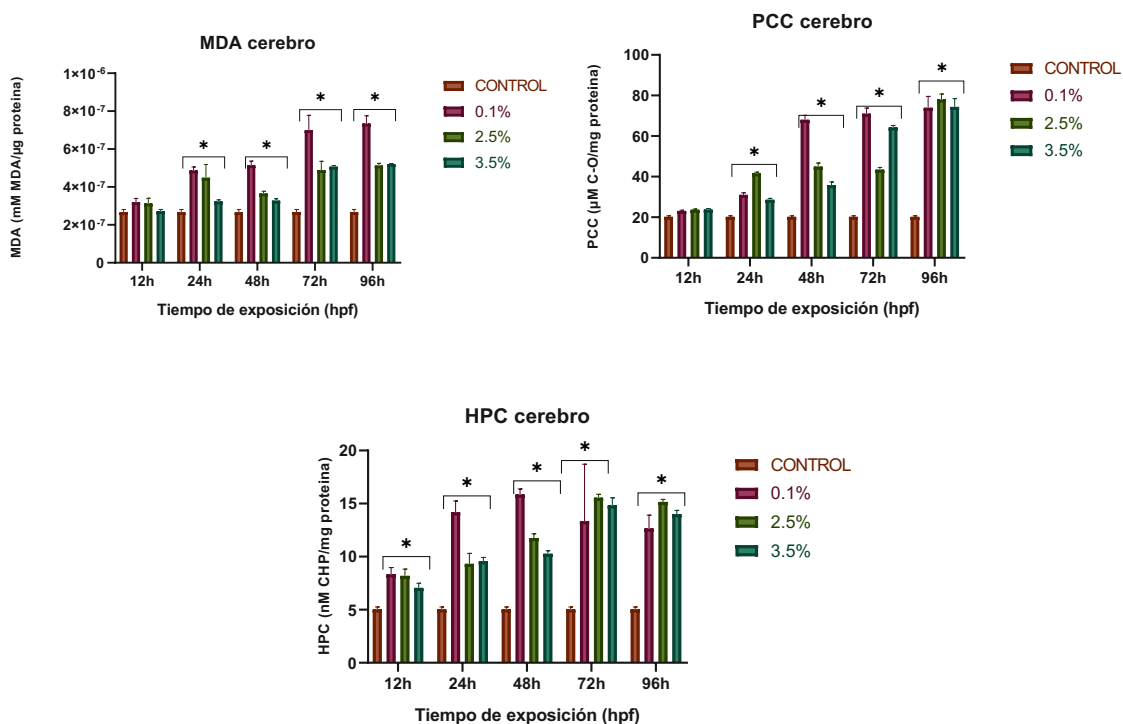


Fig. 17 Niveles de lipoperoxidación (LPX), proteínas carboniladas (POX) e hidroperóxidos (HPX) en cerebro

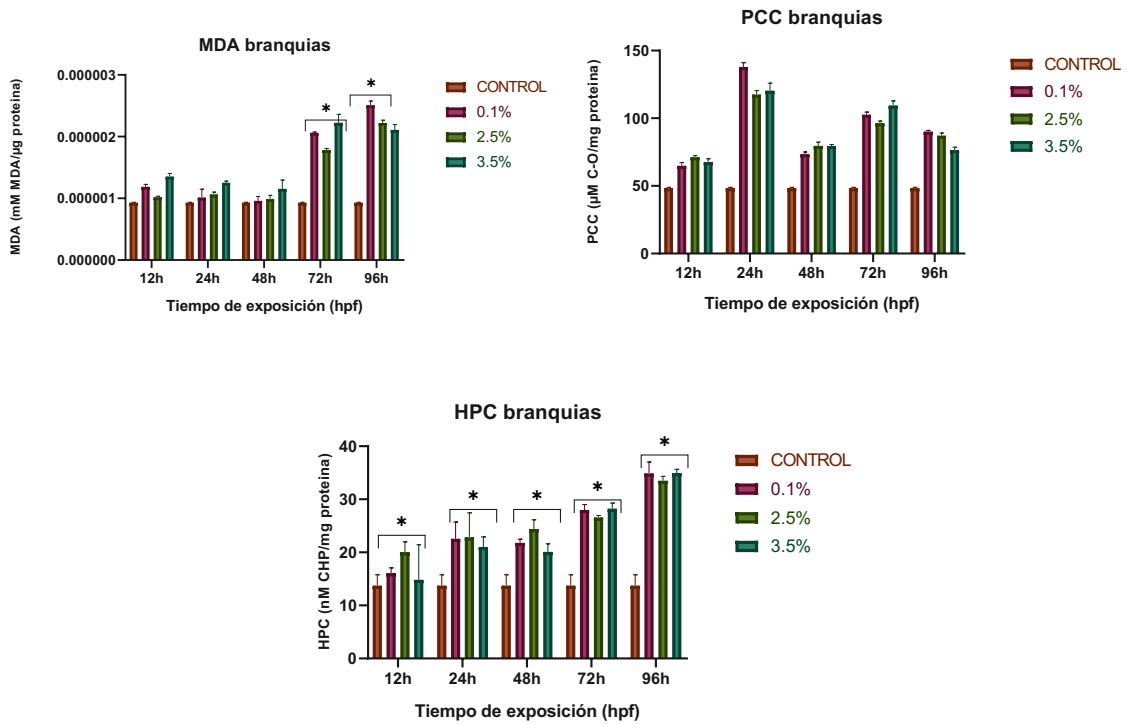
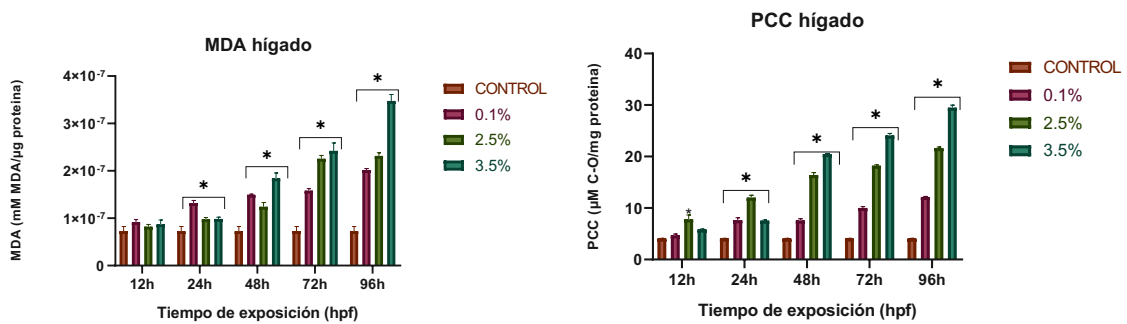


Fig. 18 Niveles de lipoperoxidación (LPX), proteínas carboniladas (POX) e hidroperóxidos (HPX) en branquias



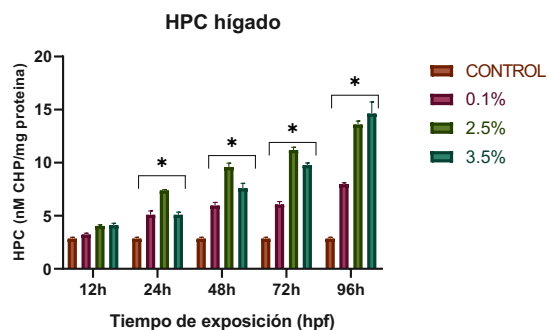


Fig. 19 Niveles de lipoperoxidación (LPX), proteínas carboniladas (POX) e hidroperóxidos (HPX) en hígado

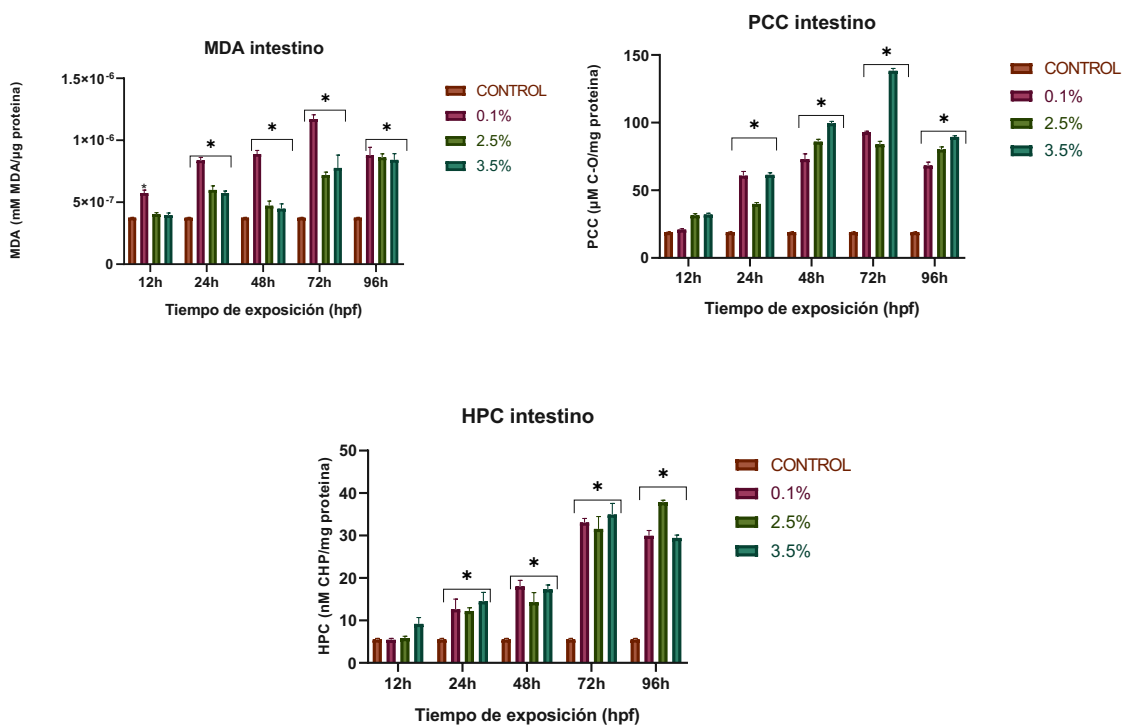
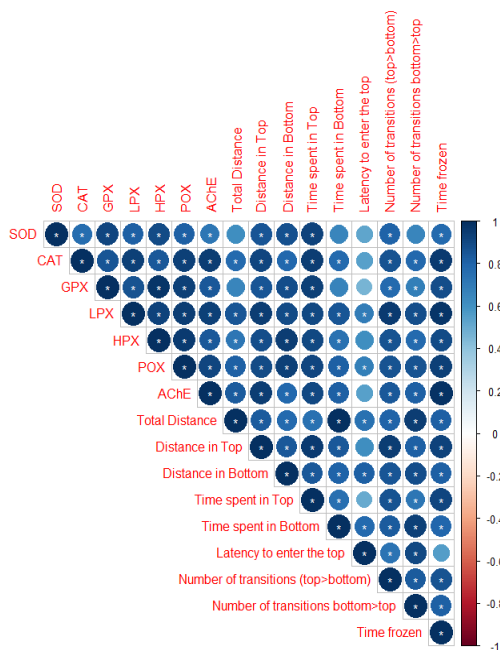


Fig. 20 Niveles de lipoperoxidación (LPX), proteínas carboniladas (POX) e hidroperóxidos (HPX) en intestino.

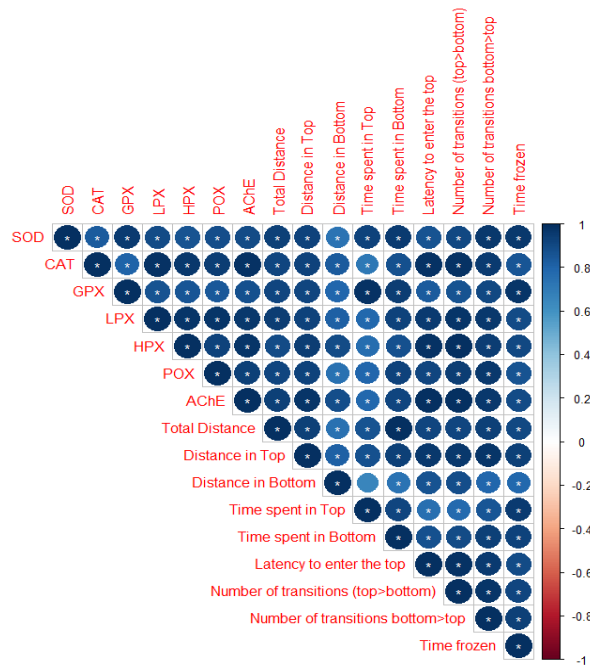
5.9 Correlación de Pearson evaluado en cerebro, entre los biomarcadores de daño oxidativo y biomarcadores de neurotoxicidad

Se realizó una correlación de Pearson en los biomarcadores de daño oxidativo y biomarcadores de neurotoxicidad en cerebro (Fig. 21), este grafico es útil para poder establecer la correlación entre las variables, de tal manera que una coloración roja y cercano a -1 en la gráfica es indicativo de una correlación negativa, caso contrario la presencia de un color azul y cercano a 1 es indicativo de una correlación positiva. En el caso de las concentraciones 0.1% y 2.5% se observa una correlación positiva entre las variables, en la concentración de 3.5% esta concentración no es apreciable en todas las variables, en algunos casos se observa una correlación negativa como lo es la latencia en la parte superior y los biomarcadores de estrés oxidativo y neurotoxicidad tienen una correlación negativa.

A)



B)



C)

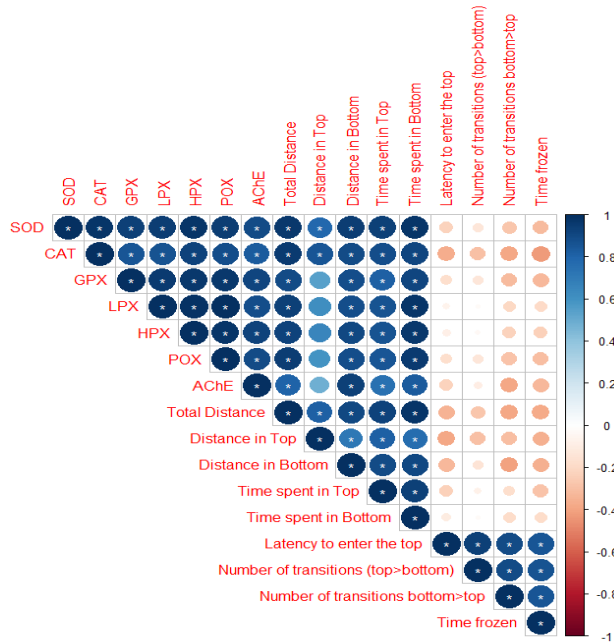
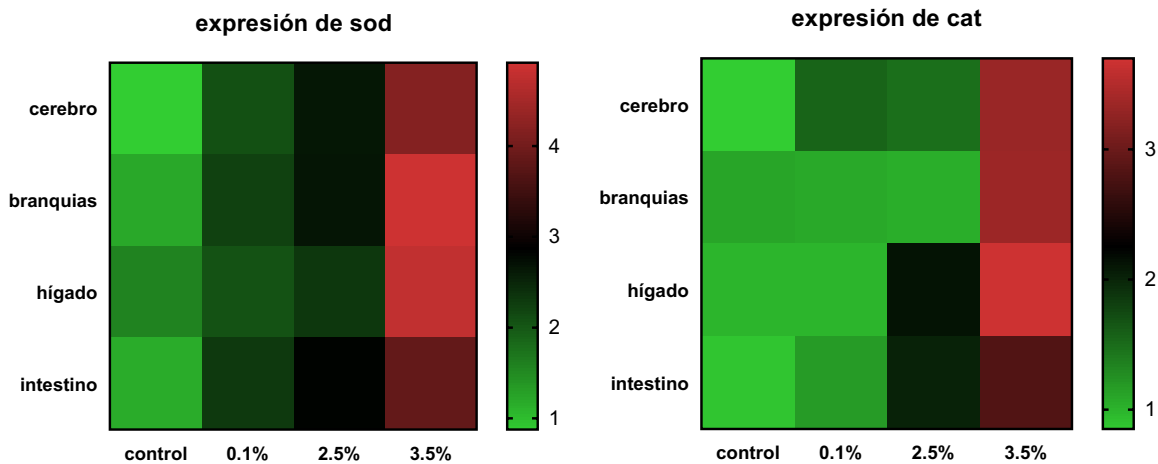


Fig. 21 Correlación de Pearson de biomarcadores de estrés oxidativo y neurotoxicidad en cerebro de *Danio rerio*

5.10 Evaluación de la expresión génica en órganos de *Danio rerio*

En cerebro, branquias, hígado e intestino se evaluó la expresión génica de sod, cat, gpx, nrf1 y nrf2. Los resultados se muestran en la Fig. 22. En todos los casos se puede observar un aumento en la expresión con respecto al control.



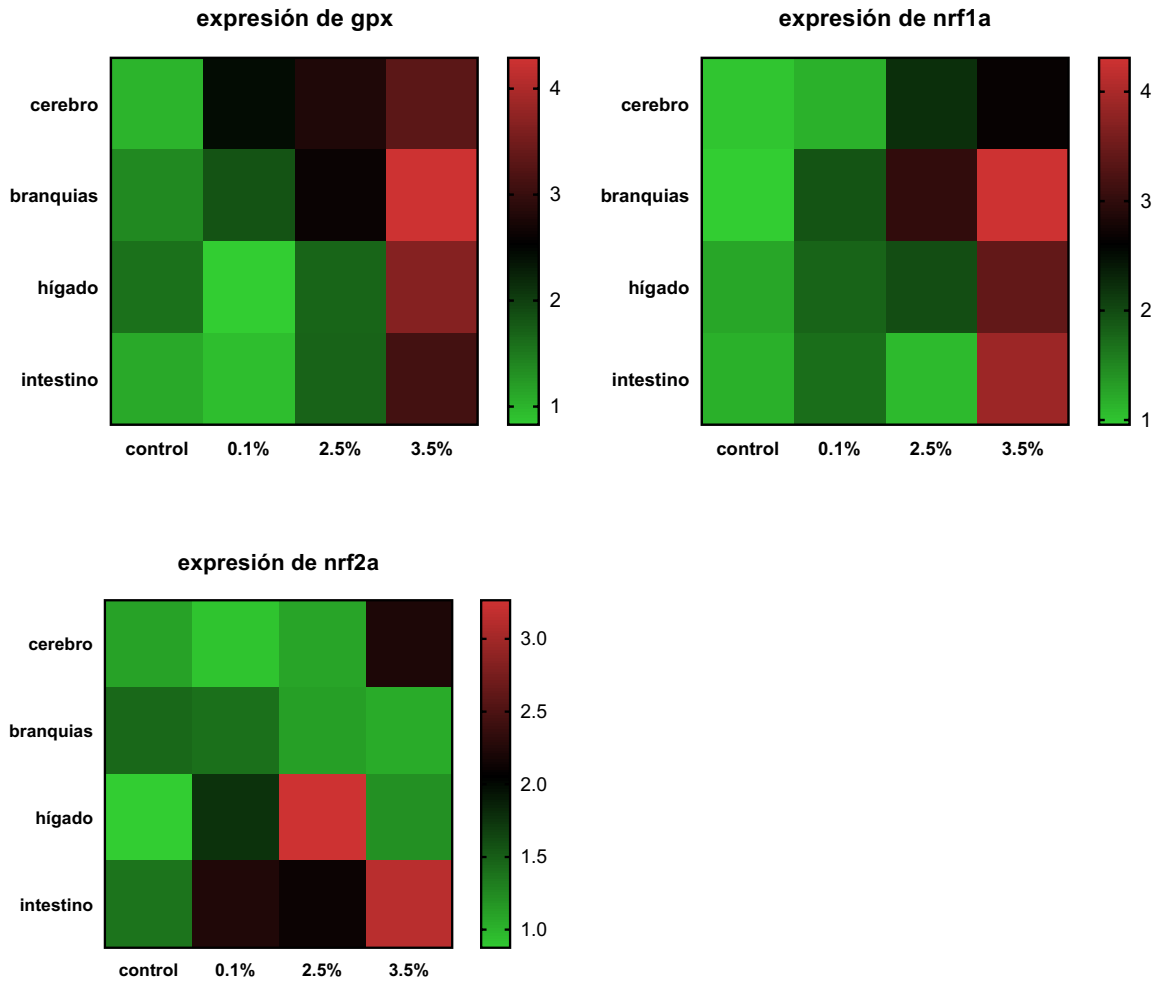


Fig. 22 Expresión relativa de sod, cat, gpx, nrf1 y nrf2 en cerebro, branquias, hígado e intestino por exposición al efluente hospitalario

6 DISCUSIÓN

En la evaluación fisicoquímica del efluente, los niveles de DBO, DQO, cloruros y sólidos suspendidos totales se encuentran por arriba de los límites permisibles por la normatividad mexicana, lo que implica que esta agua no es apta para descargarse en el sistema de alcantarillado municipal. Cabe mencionar que la normatividad no incluye parámetros como oxígeno disuelto, niveles de amonio, hipoclorito de sodio, y no ha considerado estudios recientes sobre contaminantes emergentes, para

poder garantizar que las descargas de agua cumplen con la calidad necesaria para ser desechada en el alcantarillado municipal, sobre todo en aguas provenientes de hospitales, las cuales, como ya se mencionó, son mezclas complejas.

Con respecto a lo anterior, en el presente estudio se detectó la presencia de diversos fármacos, como ketorolaco, ibuprofeno, naproxeno, paracetamol, dexametasona, hidrocortisona, esomeprazol, omeprazol y ranitidina; metales como arsénico, cadmio, cobre, cromo, mercurio, níquel, plomo y zinc, en congruencia con la naturaleza misma de este tipo de descargas. Lamentablemente, los valores en los que se encuentran este tipo de sustancias no pueden compararse con ninguna normatividad vigente debido a la inexistencia de esta, en consecuencia, no es posible establecer si dichas concentraciones detectadas sean seguras o no para el ecosistema en donde sean descargadas. Con el objetivo de responder esta interrogante es que realizamos este estudio toxicológico, el cual puso de manifiesto que, aunque cumple con la mayoría de los parámetros establecidos por la normatividad, produce efectos adversos en organismos expuestos al efluente. Este daño tóxico pudiera deberse a la presencia de fármacos y sus metabolitos, debido a que son sustancias con actividad biológica y ejercen un efecto sobre las biomoléculas de los organismos. En este sentido, los fármacos tienen la capacidad de generar estrés oxidativo; la generación de especies reactivas de oxígeno puede llegar a dañar ácidos nucleicos o proteínas cuyos efectos y consecuencias pueden llegar a observarse con una manifestación fenotípica. Para evaluar estos efectos de forma macroscópica, se da un seguimiento al desarrollo embrionario debido a que es la etapa en la cual ocurre una replicación celular rápida y puede observarse cualquier daño a nivel celular debido a que se reflejaría en el desarrollo del organismo completo (Luja-Mondragón *et al.*, 2019b; Tenorio-Chávez *et al.*, 2020).

En el presente estudio se demostró que el efluente hospitalario tiene una elevada capacidad de generar mortalidad, debido a que la concentración más baja evaluada (0.5%) tuvo una mortalidad de 31.9% y aumentó de forma gradual, llegando al máximo de 66.7% en la concentración más alta evaluada (4%). De igual forma se demostró que el efluente tiene la capacidad de generar efectos teratogénicos y el

porcentaje de la presencia de éstos es proporcional a la concentración de exposición. La presencia de sustancias de diversa naturaleza química implica el riesgo de que se genere bioacumulación en organismos como *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Clarias gariepinus* (Ramirez *et al.*, 2007; Schultz *et al.*, 2010; Olvera-Néstor *et al.*, 2016; Alimba, Ajiboye and Fagbenro, 2017; Derikvandy *et al.*, 2020) ya que puede distribuirse ampliamente en diversos sistemas acuáticos.

Los resultados obtenidos en el ensayo ZFET mostraron que la CL50 en embriones fue de 2.328% con un intervalo de confianza del 95% de 1.830 - 3.149 y una CE50 de 2.607% con un intervalo de confianza del 95% de 2.035 - 3.707. En comparación con otros estudios de embriotoxicidad reportados como son los de Lujá-Mondragón (2019) en *Cyprinus carpio* cuya CL50 fue de 5.56% y CE50 de 3.85%, en el caso de Tenorio-Chávez (2020) en *Danio rerio* y obtuvo una CL50 de 6.1% y una CE50 de 2.5%, se observa que el pez cebra en una especie susceptible a la presencia de efluentes y que las especies acuáticas pueden sufrir embriotoxicidad por exposición a estas sustancias; así mismo que la composición de los efluentes descargados influyen en la concentración letal cincuenta y en la concentración efectiva de malformación.

La observación de estos organismos a los diferentes tiempos de exposición nos permitió detectar que el efluente produce mayormente escoliosis, edema de saco vitelino, edema pericárdico, retraso en la eclosión malformaciones craneales y malformación de cola. Con respecto al edema de saco vitelino, y edema pericárdico Hollert *et. al* (2003) reporta que dicha malformación se debe a una afección en la membrana celular la cual genera una alteración osmótica con la subsecuente hiperacumulación de líquidos. La presencia de un edema pericárdico pone en riesgo la sobrevivencia de los embriones, esto debido a que la acumulación de líquido durante esta pericarditis aumenta la contracción cardíaca pudiendo generar un taponamiento cardíaco (Zodrow, Stegeman and Tanguay, 2004).

La curvatura de la columna presentada en la escoliosis se produce durante la etapa de la embriogénesis, aquí especies pertenecientes a los teleósteos como lo es

Danio rerio tienen la susceptibilidad innata de desarrollar este tipo de deformidades espinales, la cual está asociada a factores tanto ambientales como genéticos (Grimes *et al.*, 2016).

Otra característica importante al evaluar el daño embrionario es la eclosión debido a que, si se presenta una eclosión temprana, el embrión sería incapaz de realizar sus funciones acuáticas debida a su inmadurez fisiológica; caso contrario si existe un retraso en su eclosión existe el riesgo de que sean afectados por los contaminantes presentes en su medio debido a que el sistema inmunológico no está completamente desarrollado (A. V. Hallare *et al.*, 2005; Arnold V. Hallare *et al.*, 2005). Tierney reporta la existencia de fármacos que inhiben la actividad de acetilcolinesterasa lo que provoca un daño muscular progresivo en el musculo esquelético lo que se visualiza como poca movilidad del embrión (Tierney, 2011), y en consecuencia a esto se retrasa la ruptura del corion en el proceso de eclosión. La presencia de zinc en efluente puede también afectar este proceso de eclosión; este metal tiene la capacidad de retrasar este proceso hasta por siete días o incluso inducir a la muerte de embriones por no eclosionar (12 días). Así mismo el cobre presente en este efluente tiene la capacidad de retrasar la eclosión e inducir malformaciones en la cola, edema pericárdico y aumento de la mortalidad; debido a que este metal genera radicales libres que atacan a los ácidos grasos de la membrana modificando su morfología (Jezierska, Ługowska and Witeska, 2009; Margolis *et al.*, 2016; Gouva *et al.*, 2020).

Estudios realizados en *Danio rerio* de los efectos de la exposición a naproxeno, genera edema pericárdico, retaso en la eclosión hipopigmentación debido a la capacidad de éste fármaco de interactuar con grupos hidrofílicos presentes en la membrana, lo que facilita su paso a través de la misma, provocando que interactúe con biomoléculas involucradas en el desarrollo del embrión y origine hemorragias, hipopigmentación y deformidad craneofacial (Li *et al.*, 2016).

La segunda parte del presente estudio se realizó en adultos de pez cebrá, con la finalidad de evaluar el daño toxicológico a nivel neuronal, celular y genético. La prueba

de Novel Tank nos permitió observar comportamientos típicos de ansiedad en el pez, los cuales incluyen movimientos de exploración reducida, que quedan en evidencia con el incremento de los tiempos de congelación, los cuales los peces del grupo control no presentaron estos estadios, por el contrario, mostraron interés en explorar, también disminuyeron considerablemente la distancia recorrida con respecto al control.

La geotaxis es otro indicativo de ansiedad, se refiere a la preferencia del pez por estar en el fondo, en este caso los peces expuestos manifestaron una menor geotaxis, es decir, prefirieron permanecer en la parte superior de la pecera. En todas las concentraciones de exposición (0.1, 2.5 y 3.5%) mostraron menor latencia para explorar la parte inferior y marcados episodios de congelación.

El sistema serotoninérgico se asocia a estrés en peces, en el cuál aquellos que se encuentren estresados presentan altos niveles de serotonina; este neurotransmisor regula el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, este eje controla la respuesta al estrés (Winberg, Nilsson and Olsén, 1992). Existen estudios que demuestran que la exposición de *Danio rerio* a un efluente de tenería es capaz de provocar neurotoxicidad, provocando cambios conductuales, tanto en aspectos visuales como conductuales e incluso los efluentes por la elevada cantidad de microcontaminantes pueden provocar alteraciones conductuales incluso en su estado larvario (Chagas *et al.*, 2019; Rothe *et al.*, 2021).

Para entender mejor este daño neurotóxico provocado por el efluente, se evaluaron los niveles de acetilcolinesterasa, enzima que cataliza la hidrólisis de acetilcolina, esta enzima esta relacionada con el neurotransmisor serotonina, debido a que éste último aumenta los niveles de calcio intracelular y de igual forma libera acetilcolina (Yang *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos muestran una disminución en los niveles de acetilcolina directamente proporcional a la concentración de exposición. Similar a estudios realizados en *Cyprinus carpio* y *Cnesterodon decemmaculatus* en los cual se observó una elevada disminución de los niveles de esta enzima por exposición a aguas de rio altamente contaminadas (De la Torre, Ferrari and

Salibián, 2002). Un estudio realizado por Al-Ghais (2013) con efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales usando a *Tilapia mossambica* como bioindicador determinó bajos niveles de acetilcolinesterasa tanto en hígado como músculo del pez, con el fin de evaluar si esta disminución de actividad era reversible se realizó una depuración al efluente y nuevamente se determinaron los niveles de ésta enzima, como resultado pudieron observar que en el músculo se pudo restaurar en su totalidad, sin embargo en el hígado solo se alcanzó una restauración parcial (Al-Ghais, 2013). Un estudio similar, pero éste realizado en efluentes de la industria de fertilizantes observaron que la exposición de *Channa striatus* por 96h y 15 días a tres concentraciones diferentes (3.5, 4.7, y 7.0%) reducen significativamente los niveles de ésta enzima (entre un 64 y 75%) en cerebro y branquias, en menor proporción pero igual de importante en músculos, hígado y corazón con una reducción entre 40 y 59%, el órgano que presentó menos inhibición fue el riñón (14-18%) (Yadav *et al.*, 2009).

Las evaluaciones de estrés oxidativo en realizadas en *Danio rerio* indican el efluente genera radicales libres con la subsecuente generación de efectos oxidativos. En el proceso de peroxidación de fosfolípidos los radicales libres generados son el radical hidroxilo, superóxido y peroxilo los cuales tienen la capacidad de romper el equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes generando un daño celular (Ajayan KV1, 2012).

La naturaleza heterogénea del efluente implica que en el organismo expuesto se generen diversos mecanismos de interacción de los fármacos, pueden presentarse interacciones sinérgicas que es la generación de un efecto mayor a la suma de los efectos individuales de cada sustancia, puede ser antagónico, los cuales pueden bloquear o reducir su efecto. Por esta interacción farmacológica es que resulta interesante ver los efectos que tiene el efluente sobre la respuesta antioxidante. En este estudio para el caso específico de cerebro, a las 48h de exposición hubo una disminución significativa de la enzima SOD en todas las concentraciones, indicando un consumo marcado de la misma en un intento de equilibrar la acción oxidante. Por el contrario CAT y GPX mostraron un aumento significativo importante a partir de las 48h, si bien a las 48 horas pareciera consumirse gran cantidad de la enzima

SOD disponible, la catalasa aumenta su actividad en la degradación de H₂O₂ de igual forma lo hace la glutatión peroxidasa. Estas enzimas antioxidantes en branquias incrementan su actividad desde las 12 horas de exposición viéndose un incremento mucho mayor a las 48 horas, este cambio tan significativo con respecto al cerebro es congruente, debido a que las branquias son el órgano respiratorio y osmoregulador activo al que en primera instancia tiene contacto el efluente y pudiera aquí estar sucediendo una bioacumulación de sustancias que provoquen la necesidad de una respuesta mayor de las enzimas antioxidantes. Un estudio realizado por Ching *et al.* (2009) evaluó el impacto que tiene el amonio sobre las branquias de *Boleophthalmus boddarti* en el que a las doce horas de exposición aumento la actividad de enzimas antioxidantes, así como la lipoperoxidación, proteínas p53 y p38 y posterior a las 48 horas las branquias tuvieron la capacidad de recuperarse (Ching *et al.*, 2009).

En el hígado se presentó un aumento significativo de las enzimas antioxidantes con respecto al control, debido a que las células Kupffer, los hepatocitos y las células endoteliales al estar expuestas son más propensas de sufrir daño oxidativo (Li *et al.*, 2015). El pez cebra es susceptible a varios fármacos que pueden comprometer la integridad del hígado, como azitracina, bisfenol A, oxido de cobre, fenitoína entre otros; y al evaluar sus biomarcadores de estrés oxidativo se observa un incremento en la actividad de los mismos (Chowdhury and Saikia, 2020; Cardoso-Vera *et al.*, 2022; Heredia-García *et al.*, 2022)

En la evaluación de lipoperóxidos, proteínas carboniladas e hidroperóxidos en cerebro, branquias, hígado e intestino de adultos de pez cebra mostraron una respuesta proporcional a la concentración y tiempo de exposición. Estudios similares como por ejemplo la evaluación de la toxicidad de cadmio en *Oreochromis niloticus*, de fluoxetina en *Corbicula huminea*, aumenta los niveles de biomarcadores de estrés, entre ellos el MDA que es el producto mas destacado de la peroxidación lipídica (Almeida *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2015).

Debido al daño oxidativo que genera el efluente sobre adultos de *Danio rerio* se realizó la evaluación de la expresión génica de los genes involucrados en la codificación de enzimas antioxidantes y factores de transcripción que defienden al organismo contra el estrés (nrf1 y nrf2) (Jaiswal, 2004; Yang *et al.*, 2021) .

En los resultados obtenidos durante la evaluación de la expresión génica, podemos observar que el nivel de expresión relativo aumenta conforme aumentamos la concentración de exposición, para todos los casos a excepción de nrf2 en branquias, cuya expresión mas alta se presentó a la concentración de 2.5%.

La presencia de este incremento a nivel génico indica que la molécula de ADN se ve afectada por la presencia de especies reactivas de oxígeno y que son los genes el último objetivo alterado, así mismo estos resultados van en concordancia con la actividad de enzimas antioxidantes. Diversos estudios en los que se evaluaron la expresión génica de biomarcadores de estrés oxidativo son congruentes con los resultados obtenidos, entre ellos la evaluación de los efectos de exposición a sustancias como de ftalato de dimetilo, prozac, naproxeno, y raíces como *Sanguinaria canadensis*, en *Danio rerio*,(Stancová *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2016; Cong *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021)

7 CONCLUSION

El efluente hospitalario después de pasar por la planta tratadora de aguas tiene presencia de metales pesados y fármacos, los cuales son contaminantes emergentes que pueden estar interactuando para ejercer un efecto biológico en los organismos que se encuentren en exposición a este. El presente estudio permitió determinar la concentración letal 50 del efluente hospitalario para los embriones fue de 2.328% mientras que la concentración efectiva de malformación fue de 2.607%. Los principales efectos teratogénicos encontrados fueron edema de saco vitelino, edema pericárdico, escoliosis, malformación craneofacial y retraso en la eclosión. Estos efectos en consecuencia de la oxidación de biomoléculas por lo que podemos

concluir que bajas concentraciones del efluente hospitalario induce estrés oxidativo provocando alteraciones en el desarrollo embrionario y puede conducir a la muerte del organismo.

El efluente hospitalario a concentraciones de 0.1%, 2.5% y 3.5% es capaz de alterar el comportamiento del pez en su etapa adulta, los parámetros evaluados indican que presenta episodios de ansiedad, lo que en un ambiente acuático natural este organismo sería mas susceptible a sus depredadores por estas alteraciones conductuales. La disminución en los niveles de acetilcolinesterasa se debe a la presencia de ROS lo que indica que existe un daño neuronal. El daño oxidativo se puso de manifiesto en el pez al evaluar los cuatro órganos y todos ellos manifestar la presencia de especies reactivas de oxígeno alterando los niveles de los biomarcadores en comparación con el control. El daño generado por el efluente alcanza los niveles de ADN al provocar una mayor activación de los genes involucrados en la respuesta al estrés, lo que indica que las enzimas están reguladas a niveles transcripcionales.

Es importante continuar con la evaluación de la expresión génica en estadios embrionarios para obtener una visión panorámica de los efectos que tiene el efluente y determinar el riesgo del mismo sobre ecosistemas acuáticos.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, C. *et al.* (2002) 'Removal of Antibiotics from Surface and Distilled Water in Conventional Water Treatment Processes', *Journal of Environmental Engineering*, 128(3), pp. 253–260. doi: 10.1061/(asce)0733-9372(2002)128:3(253).

Ajayan KV1, S. M. (2012) 'Heavy metal induced antioxidant defense system of green microalgae and its effective role in phycoremediation of tannery effluent.', *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(22), pp. 1056–1062. doi: 10.3923/pjbs.2012.1056.1062.

Al-Ghais, S. M. (2013) 'Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish', *Marine Pollution Bulletin*, 74(1), pp. 183–186. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.07.005.

Aleström, P. *et al.* (2020) 'Zebrafish: Housing and husbandry recommendations', *Laboratory Animals*, 54(3), pp. 213–224. doi: 10.1177/0023677219869037.

Alimba, C. G., Ajiboye, R. D. and Fagbenro, O. S. (2017) 'Dietary ascorbic acid reduced micronucleus and nuclear abnormalities in *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) exposed to hospital effluent', *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(5), pp. 1325–1335. doi: 10.1007/s10695-017-0375-y.

Almeida, J. A. *et al.* (2009) 'Oxidative stress biomarkers and aggressive behavior in fish exposed to aquatic cadmium contamination', 7(1), pp. 103–108.

American Veterinary Medical Association (2020) *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition*, *Nūbat Ramal al-Māya in Cultural Context*. doi: 10.1163/9789004294530_006.

Amuda, O. S. and Alade, A. (2006) 'Coagulation/flocculation process in the treatment of abattoir wastewater', *Desalination*, 196(1–3), pp. 22–31. doi: 10.1016/j.desal.2005.10.039.

Andrade, V. M., Aschner, M. and Marreilha dos Santos, A. P. (2017) *Neurotoxicity of Metal Mixtures, Advances in Neurobiology*. doi: 10.1007/978-3-319-60189-2_12.

Barnard, E. A. (1970) 'Enzymatic Destruction of Acetylcholine', 7(iii), pp. 201–224.

Blanco-Vives, B. and Sánchez-Vázquez, F. J. (2009) 'Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish', *Physiology and Behavior*, 98(3), pp. 268–275. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.05.015.

Bolong, N. *et al.* (2009) 'A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal', *Desalination*, 239(1–3), pp. 229–246. doi: 10.1016/j.desal.2008.03.020.

Cardoso-Vera, J. D. *et al.* (2022) 'Multi-biomarker approach to evaluate the neurotoxic effects of environmentally relevant concentrations of phenytoin on adult zebrafish *Danio rerio*', *Science of the Total Environment*, 834(April), p. 155359. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155359.

Chagas, T. Q. *et al.* (2019) 'Behavioral toxicity of tannery effluent in zebrafish (*Danio rerio*) used as model system', *Science of the Total Environment*, 685, pp. 923–933. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.253.

Chakraborty, C. *et al.* (2016) 'Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity', *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12951-016-0217-6.

Chakravarthy, S. *et al.* (2014) 'Zebrafish as an in vivo high-throughput model for genotoxicity', *Zebrafish*, 11(2), pp. 154–166. doi: 10.1089/zeb.2013.0924.

Chen, H. *et al.* (2015) 'Chemosphere Effects of fluoxetine on behavior , antioxidant enzyme systems , and multixenobiotic resistance in the Asian clam *Corbicula fluminea*', *CHEMOSPHERE*, 119, pp. 856–862. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.08.062.

Chen, S. S., Chang, L. S. and Wei, Y. H. (2001) 'Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele', *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), pp. 1328–1334. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00536-6.

Ching, B. *et al.* (2009) 'Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper)', *Aquatic Toxicology*, 95(3), pp. 203–212. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.09.004.

Chowdhury, S. and Saikia, S. K. (2020) 'Oxidative Stress in Fish: A Review', *Journal of Scientific Research*, 12(1), pp. 145–160. doi: 10.3329/jsr.v12i1.41716.

CONAGUA (1997) 'Normas Oficiales Mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 NOM-002-SEMARNAT-1996 NOM-003-SEMARNAT-1997', p. 65.

Cong, B. *et al.* (2020) 'The Impact on Antioxidant Enzyme Activity and Related Gene Expression Following Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Exposure to Dimethyl Phthalate', pp. 1–12. doi: 10.3390/ani10040717.

Cunha, V. *et al.* (2016) 'Danio rerio embryos on Prozac – Effects on the detoxification mechanism and embryo development', *Aquatic Toxicology*, 178, pp. 182–189. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.08.003.

Derikvandy, A. *et al.* (2020) 'Genotoxicity and oxidative damage in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to effluent from ethyl alcohol industry.', *Chemosphere*, 251, p. 126609. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126609.

Dooley, K. and Zon, L. I. (2000) 'Zebrafish: A model system for the study of human disease', *Current Opinion in Genetics and Development*, 10(3), pp. 252–256. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00074-5.

Dvir, H. *et al.* (2010) 'Acetylcholinesterase: From 3D structure to function', *Chemico-Biological Interactions*, 187(1–3), pp. 10–22. doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.042.

Egan, R. J. *et al.* (2009) 'Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish', *Behavioural Brain Research*, 205(1), pp. 38–44. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.022.

Fang, F. *et al.* (2009) 'Molecular phylogenetic interrelationships of the south Asian cyprinid genera *Danio*, *Devario* and *Microrasbora* (Teleostei, Cyprinidae, Danioninae)', *Zoologica Scripta*, 38(3), pp. 237–256. doi: 10.1111/j.1463-6409.2008.00373.x.

Finaud, J., Lac, G. and Filaire, E. (2006) 'Oxidative stress: Relationship with exercise and training', *Sports Medicine*, 36(4), pp. 327–358. doi: 10.2165/00007256-200636040-00004.

Gouva, E. *et al.* (2020) 'Comparative study of the effects of heavy metals on embryonic development of zebrafish', *Aquaculture Research*, 51(8), pp. 3255–3267. doi: 10.1111/are.14660.

Grimes, D. T. *et al.* (2016) 'Zebrafish models of idiopathic scoliosis link cerebrospinal fluid flow defects to spine curvature', *Science*, 352(6291), pp. 1341–1344. doi: 10.1126/science.aaf6419.

Hallare, Arnold V. *et al.* (2005) 'Assessing water quality in a tropical lake using biomarkers in zebrafish embryos: Developmental toxicity and stress protein responses', *Environmental Monitoring and Assessment*, 104(1–3), pp. 171–187. doi: 10.1007/s10661-005-1610-z.

Hallare, A. V. *et al.* (2005) 'Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos', *Journal of Thermal Biology*, 30(1), pp. 7–17. doi: 10.1016/j.jtherbio.2004.06.002.

Heredia-García, G. *et al.* (2022) 'Multi-biomarker approach and IBR index to evaluate the effects of bisphenol A on embryonic stages of zebrafish (*Danio rerio*)', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 94(June), pp. 0–10. doi:

10.1016/j.etap.2022.103925.

Hermesen, S. A. B. *et al.* (2011) 'Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies', *Toxicology in Vitro*. doi: 10.1016/j.tiv.2011.01.005.

Holtzman, N. G. *et al.* (2016) 'Learning to fish with genetics: A primer on the vertebrate model *Danio rerio*', *Genetics*, 203(3), pp. 1069–1089. doi: 10.1534/genetics.116.190843.

Howe, K. *et al.* (2013) 'The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome', *Nature*, 496(7446), pp. 498–503. doi: 10.1038/nature12111.

Jaiswal, A. K. (2004) 'Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression', *Free Radical Biology and Medicine*, 36(10), pp. 1199–1207. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.074.

Jeziarska, B., Ługowska, K. and Witeska, M. (2009) 'The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review)', *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4), pp. 625–640. doi: 10.1007/s10695-008-9284-4.

Jones, D. P. (2006) 'Redefining Oxidative Stress', *Antioxidants and redox signaling*, 8, pp. 9–10. doi: 10.1089/ars.2006.8.1865.

Kalueff, A. V. *et al.* (2013) 'Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond', *Zebrafish*, 10(1), pp. 70–86. doi: 10.1089/zeb.2012.0861.

Kavlock, R. J. *et al.* (1996) 'Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop', *Environmental Health Perspectives*, 104(SUPPL. 4), pp. 715–740. doi: 10.1289/ehp.96104s4715.

Keller, P. J. *et al.* (2008) 'Reconstruction of Zebrafish Early Light Sheet

Microscopy', 322(November), pp. 1065–1069.

Kimmel, Charles B. *et al.* (1995) 'Stages of embryonic development of the zebrafish', *Developmental Dynamics*, 203(3), pp. 253–310. doi: 10.1002/aja.1002030302.

Kimmel, Charles B *et al.* (1995) 'Stages of Embryonic Development of the Zebrafish', 10.

De la Torre, F. R., Ferrari, L. and Salibián, A. (2002) 'Freshwater pollution biomarker: Response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species', *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 131(3), pp. 271–280. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00014-5.

Laffite, A. *et al.* (2016) 'Hospital effluents are one of several sources of metal, antibiotic resistance genes, and bacterial markers disseminated in sub-saharan urban rivers', *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.01128.

Langford, K. H. and Thomas, K. V. (2009) 'Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works', *Environment International*, 35(5), pp. 766–770. doi: 10.1016/j.envint.2009.02.007.

Lawrence, C. (2007) 'The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review', *Science Direct*, 269, pp. 1–20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.

Lawrence, C. and Mason, T. (2012) 'Zebrafish housing systems: A review of basic operating principles and considerations for design and functionality', *ILAR Journal*, 53(2), pp. 179–191. doi: 10.1093/ilar.53.2.179.

Lesser, M. P. (2006) 'Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology', *Annual Review of Physiology*, 68(3), pp. 253–278. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001.

Levin, E. D., Bencan, Z. and Cerutti, D. T. (2007) 'Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish', *Physiology and Behavior*, 90(1), pp. 54–58. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.08.026.

Li, Q. *et al.* (2016) 'Acute toxicity and histopathological effects of naproxen in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages', *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), pp. 18832–18841. doi: 10.1007/s11356-016-7092-4.

Li, S. *et al.* (2015) 'The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), pp. 26087–26124. doi: 10.3390/ijms161125942.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Llinas, R. R. and Greenfield, S. A. (1987) 'On-line visualization of dendritic release of acetylcholinesterase from mammalian substantia nigra neurons', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(9), pp. 3047–3050. doi: 10.1073/pnas.84.9.3047.

López-Pacheco, I. Y. *et al.* (2019) 'Anthropogenic contaminants of high concern: Existence in water resources and their adverse effects', *Science of the Total Environment*, 690, pp. 1068–1088. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.052.

López-Serna, R., Petrović, M. and Barceló, D. (2012) 'Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain)', *Science of the Total Environment*, 440, pp. 280–289. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.027.

Luja-Mondragón, M. *et al.* (2019a) 'Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes', *Science of the Total Environment*, 660, pp. 751–764. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.072.

Luja-Mondragón, M. *et al.* (2019b) 'Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes', *Science of the Total Environment*, 660, pp. 751–764. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.072.

Magdaleno, A. *et al.* (2014) 'Ecotoxicological and genotoxic evaluation of Buenos Aires city (Argentina) hospital wastewater', *Journal of Toxicology*, 2014. doi: 10.1155/2014/248461.

Margolis, K. G. *et al.* (2016) 'Serotonin transporter variant drives preventable gastrointestinal abnormalities in development and function', *Journal of Clinical Investigation*, 126(6), pp. 2221–2235. doi: 10.1172/JCI84877.

Maximino, C. *et al.* (2010) 'Measuring anxiety in zebrafish: A critical review', *Behavioural Brain Research*, 214(2), pp. 157–171. doi: 10.1016/j.bbr.2010.05.031.

Maximino, C. *et al.* (2012) 'A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish', *Behaviour*, 149(10–12), pp. 1099–1123. doi: 10.1163/1568539X-00003029.

McClure, M. M., McIntyre, P. B. and McCune, A. R. (2006) 'Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*', *Journal of Fish Biology*, 69(2), pp. 553–570. doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01125.x.

Mezzomo, N. J. *et al.* (2016) 'The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: A comparative study using the novel tank and the light-dark tasks', *Neuroscience Letters*, 613, pp. 19–24. doi: 10.1016/j.neulet.2015.12.037.

Olvera-Néstor, C. G. *et al.* (2016) 'Biomarkers of Cytotoxic, Genotoxic and Apoptotic Effects in *Cyprinus carpio* Exposed to Complex Mixture of Contaminants from Hospital Effluents', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(3), pp. 326–332. doi: 10.1007/s00128-015-1721-3.

Orias, F. and Perrodin, Y. (2013) 'Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review', *Science of the Total Environment*, 454–455, pp. 250–276. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.02.064.

Pérez-Alvarez, I. *et al.* (2018) 'Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, Mexico, and evaluation of their toxic impact', *Environmental Pollution*, 240, pp. 330–341. doi: 10.1016/j.envpol.2018.04.116.

Petrovic, M. *et al.* (2003) 'Occurrence and removal of estrogenic short-chain ethoxy nonylphenolic compounds and their halogenated derivatives during drinking water production', *Environmental Science and Technology*, 37(19), pp. 4442–4448. doi: 10.1021/es034139w.

Pisoschi, A. M. and Pop, A. (2015) 'The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, pp. 55–74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

Ramirez, A. J. *et al.* (2007) 'Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Analytical Chemistry*, 79(8), pp. 3155–3163. doi: 10.1021/ac062215i.

Rasooly, R. S. *et al.* (2003) 'Genetic and Genomic Tools for Zebrafish Research : The NIH Zebrafish Initiative', *Developmental Dynamics*, 228(3), pp. 490–496. doi: 10.1002/dvdy.10366.

Rimbach, G. *et al.* (1999) 'Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems', *Archives of Animal Nutrition*, 52(3), pp. 203–222. doi: 10.1080/17450399909386163.

Rothe, L. E. *et al.* (2021) 'Effects of conventionally-treated and ozonated wastewater on mortality, physiology, body length, and behavior of embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*)', *Environmental Pollution*, 286, p. 117241. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117241.

Scholz, S. *et al.* (2008) 'The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing', *Environmental Science and Pollution Research*, 15(5), pp. 394–404. doi: 10.1007/s11356-008-0018-z.

Schultz, M. M. *et al.* (2010) 'Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: Occurrence and fate in water and sediment and selective uptake in fish neural tissue', *Environmental Science and Technology*, 44(6), pp. 1918–1925. doi: 10.1021/es9022706.

SEMARNAT (1998) 'NORMA Oficial Mexicana NOM-002-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.', *Diario Oficial de la Federación*, pp. 1–7.

Servos, M. R. *et al.* (2005) 'Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants', *Science of the Total Environment*, 336(1–3), pp. 155–170. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.05.025.

Shin, J. T. and Fishman, M. C. (2002) 'FROM ZEBRAFISH TO HUMAN: Modular Medical Models', (24). doi: 10.1146/annurev.genom.3.031402.131506.

Sies, H. (2015) 'Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine', *Redox Biology*, 4, pp. 180–183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

Solís, H., López-Hernández, E. and Cortés-Gasca, D. (2008) 'La excitabilidad neuronal y los canales de potasio', *Archivos de Neurociencias*, 13(3), pp. 195–201.

Soreq, H. (2001) 'Acetylcholinesterase — new roles for an old actor', *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), pp. 294–302. doi: 10.1038/35067589.

Spence, R. *et al.* (2008) 'The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*', *Biological Reviews*, 83, pp. 13–34. doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.

Stancová, V. *et al.* (2015) 'Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug (

NSAID) naproxen on gene expression of antioxidant enzymes in zebrafish (*Danio rerio*)', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(2), pp. 343–348. doi: 10.1016/j.etap.2015.07.009.

Stewart, A. *et al.* (2012) 'Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review', *Neuropharmacology*, 62(1), pp. 135–143. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.037.

Tenorio-Chávez, P. *et al.* (2020) 'Effects of effluent from a hospital in Mexico on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*', *Science of the Total Environment*, 727. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138716.

Thomas, K. V. *et al.* (2007) 'Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works', *Journal of Environmental Monitoring*, 9(12), pp. 1410–1418. doi: 10.1039/b709745j.

Tierney, K. B. (2011) 'Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(3), pp. 381–389. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.10.011.

Urase, T. and Kikuta, T. (2005) 'Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process', *Water Research*, 39(7), pp. 1289–1300. doi: 10.1016/j.watres.2005.01.015.

Varela, A. R. *et al.* (2014) 'Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system', *Water Research*, 54, pp. 327–336. doi: 10.1016/j.watres.2014.02.003.

Verlicchi, P. *et al.* (2010) 'Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options', *Journal of Hydrology*, 389(3–4), pp. 416–428. doi: 10.1016/j.jhydrol.2010.06.005.

Verlicchi, P. *et al.* (2012) 'Hospital effluent: Investigation of the concentrations and

distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment', *Science of the Total Environment*, 430, pp. 109–118. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.055.

Weigt, S. *et al.* (2011) 'Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens', *Toxicology*. doi: 10.1016/j.tox.2011.01.004.

Westerfield, M. (2007) 'The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition', *University of Oregon Press, Eugene (Book)*.

Westerhoff, P. *et al.* (2005) 'Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes', *Environmental Science and Technology*, 39(17), pp. 6649–6663. doi: 10.1021/es0484799.

WHO (2013) 'Safe management of wastes from health-care activities. World Health Organisation', *World Health Organization*, p. 329. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85349/1/9789241548564_eng.pdf.

Williams, P. R. *et al.* (2013) 'In vivo imaging of zebrafish retina', *Cold Spring Harbor Protocols*, 8(1), pp. 28–35. doi: 10.1101/pdb.prot072652.

Winberg, S., Nilsson, G. E. and Olsén, K. H. (1992) 'Changes in brain serotonergic activity during hierarchic behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) are socially induced', *Journal of Comparative Physiology A*, 170(1), pp. 93–99. doi: 10.1007/BF00190404.

Wixon, J. (2000) 'Danio rerio , the zebrafish', 17, pp. 225–232. doi: 10.1002/1097-0061(20000930)17:3<225::AID-YEA34>3.3.CO;2-X.

Yadav, A. *et al.* (2009) 'Acetylcholinesterase: A potential biochemical indicator for biomonitoring of fertilizer industry effluent toxicity in freshwater teleost, *Channa striatus*', *Ecotoxicology*, 18(3), pp. 325–333. doi: 10.1007/s10646-008-0286-x.

Yang, X. *et al.* (2021) 'Developmental toxicity caused by sanguinarine in zebrafish

embryos via regulating oxidative stress, apoptosis and wnt pathways', *Toxicology Letters*, 350, pp. 71–80. doi: 10.1016/j.toxlet.2021.07.001.

Zodrow, J. M., Stegeman, J. J. and Tanguay, R. L. (2004) 'Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin (TCDD) in zebrafish', *Aquatic Toxicology*, 66(1), pp. 25–38. doi: 10.1016/j.aquatox.2003.07.002.