

## Capítulo VIII

### **Estrés oxidativo producido por antiinflamatorios no esteroideos sobre el bioindicador *Hyalella azteca***

Leobardo Manuel Gómez Oliván<sup>1</sup> \*

Marcela Galar Martínez<sup>2</sup>

Nadia Neri Cruz<sup>1</sup>

Hariz Islas Flores<sup>1</sup>

Arturo Colín Cruz<sup>1</sup>

Patricia Vieyra Reyes<sup>3</sup>

Nely San Juan Reyes<sup>1</sup>

Octavio Dublán García<sup>1</sup>

Leticia Xóchitl López Martínez<sup>1</sup>



## 1. Introducción

**L**a contaminación ambiental es definida como cualquier modificación indeseable de la composición natural del medio, debida a la introducción de agentes biológicos, químicos o físicos que no pertenecen al mismo. Es una consecuencia indeseable de los procesos productivos que presenta formas muy diversas, así como asociaciones y sinergismos difíciles de prever, que afectan no sólo a la salud humana sino también a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños ecológicos a veces irreversibles tales como la pérdida de la biodiversidad. Quizás el deterioro ambiental se hace más acuciante en el agua, pues es un insumo básico para la subsistencia de todo organismo vivo y para las actividades productivas del hombre (Albert y Namihira, 2004).

La contaminación del agua es ocasionada por diversos factores, entre los que destaca la introducción de diversos xenobióticos por actividades antropogénicas. Entre los más importantes y de los cuales existen muchos estudios encontramos a los metales pesados y compuestos orgánicos tales como los plaguicidas, hidrocarburos clorados, bifenilos policlorados, los productos del petróleo (particularmente hidrocarburos poli aromáticos), etc. (Burger y Gochfeld, 2004). Sin embargo, recientemente los científicos han comenzado a centrar su atención sobre un grupo de tóxicos denominados emergentes, los fármacos y los productos de higiene personal (Snyder *et al.*, 2005; Montforts *et al.*, 2007; Spindler *et al.*, 2007).

Los fármacos son productos prevenir, curar o mitigar las enfermedades. Durante miles de años, la humanidad utilizó una gran variedad de com-

puestos de origen vegetal, animal y mineral con este fin. No fue sino a partir del siglo XX, que con el desarrollo de la síntesis química, se obtuvieron nuevas sustancias de utilidad terapéutica, permitiendo el desarrollo de la industria farmacéutica, prolongando y mejorando la calidad de vida humana y animal. Sin embargo, estos fármacos y sus metabolitos, pueden incorporarse a los cuerpos de agua por diferentes vías, tales como efluentes provenientes de plantas farmacéuticas, desechos humanos (orina y heces) y desechos orgánicos provenientes de granjas, entre otros (Larsen *et al.*, 2004), lo que ha llevado en los últimos años a discutir los posibles efectos de estos xenobióticos sobre la biota acuática (Fent *et al.*, 2006).

### 1.1 Efectos sobre especies acuáticas

El mejoramiento de las técnicas analíticas han dado lugar a una mayor conciencia de la presencia de los productos farmacéuticos en el medio ambiente, la preocupación ahora se está centrando en cuanto a los posibles efectos adversos que estos compuestos pueden tener sobre los organismos que habitan estos ecosistemas, especialmente en condiciones de exposición crónica (Madden *et al.*, 2009). Los fármacos son abundantes a concentraciones de ng/L a µg/L en sistemas acuáticos naturales (Schreiber *et al.*, 2008). Por esta razón existen diversos estudios realizados sobre la presencia de AINES en medios acuáticos y los efectos tóxicos que provocan sobre las especies que ahí habitan. A continuación (tabla 1) se presentan algunos antecedentes de este tipo de estudio.

Tabla 1. Antecedentes del efecto de AINES sobre organismos acuáticos

Autor (Año)	Medicamento	Conclusión
Marques <i>et al.</i> (2004a)	Ac. Gentísico (GEN), Ácido O- hidroxihipúrico (HDP), otros metabolitos del AAS (SAL).	Evaluaron toxicidad aguda y crónica en <i>D. magna</i> y <i>D. longispira</i> , encontrando que la toxicidad del GEN>SAL>HDP, el HDP no presenta toxicidad aguda, pero en exposición crónica produce neonatos anormales y abortos. El SAL y GEN producen cambios en la reproducción y crecimiento. <i>D. longispira</i> es la más sensible a estos fármacos.
Richards <i>et al.</i> (2004)	Ibuprofeno, fluoxetina, ciprofloxacino	Hay poca respuesta a concentraciones de 6, 10 y 10 µg/L respectivamente, a concentraciones de 60, 100 y 100 µg/L (Concentración Media) y de 600, 1000 y 1000 µg/L se produce muerte de peces.
Marques <i>et al.</i> (2004b)	AAS	Estudiaron la toxicidad crónica en cladóceros, encontrando que afecta la reproducción a concentraciones de 1.8 mg/L.

Continúa...

Autor (Año)	Medicamento	Conclusión
Cleuvers (2004)	Diclofenaco, Ibuprofeno, Naproxeno, AAS	Encontraron que la toxicidad es relativamente baja. La $CE_{50}$ es 68-166 mg en Daphnidos y 72-626 mg en algas. Entre mayor es el log Kow mayor es la toxicidad. La toxicidad de mezclas de estos compuestos pueden predecirse usando el concepto de adición de concentración. La toxicidad de la mezcla fue considerable incluso a concentraciones que las sustancias simples no muestran efectos.
Yamamoto <i>et al.</i> (2005)	Ibuprofeno, acetaminofen, atenolol, fluoxentina	Determinaron el coeficiente de sorción encontrando que el de fluoxentina es mayor que el del atenolol y del ibuprofeno.
Isidori <i>et al.</i> (2005)	Naproxeno	Los fotoproductos son más tóxicos que el compuesto original en pruebas agudas y crónicas. No se encontraron efectos genotóxicos o mutagénicos.
Richards y Cole (2006)	14 medicamentos	Expusieron <i>Xenopus</i> durante 96 h a una concentración comúnmente prescrita de inhibidores selectivos de serotonina, reguladores de lípidos en sangre, AINES, antibióticos, un estimulante y un antiepiléptico. Se determinó la toxicidad, teratogenicidad, concentración mínima para inhibir el crecimiento, tipos y severidades de malformaciones y se encontró que la toxicidad varía entre las clases de fármacos analizados, así los fluoroquinolonas, cafeína, acetaminofen, carbamazepina y antibióticos son reportados no teratogénicos a exposiciones de 100 mg/L durante 96 h.
Brun <i>et al.</i> (2006)	Paracetamol, Ibuprofeno, Naproxeno, Ácido salicílico	No encontraron ningún efecto negativo en concentraciones de 32 a 500 $\mu\text{g/L}$ en la evaluación de la toxicidad aguda para <i>Daphnia magna</i> y <i>Vibrio fischeri</i> respectivamente. En cuanto a la toxicidad crónica únicamente se apreció en la alga <i>Selenastrum capricornutum</i> con el ibuprofeno.
Gravel y Vijayan (2007)	AAS	Encontraron que no hay cambios significativos en la hexocinasa del hígado, glucocinasa, lactato deshidrogenasa, piruvato cinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa y alanina amino transferasa.
Felis <i>et al.</i> (2007)	Ibuprofeno	Encontraron que la $CE_{50}$ en <i>D. magna</i> es 10-100 mg/L en 14 días, disminuye el crecimiento y la supervivencia se afecta a 80 mg/L. La reproducción se afecta a 13.4 mg/L y se inhibe completamente a 80 mg/L.
Flipin <i>et al.</i> (2007)	Ibuprofeno	Encontraron que una mayor exposición a ibuprofeno provoca aumento del número de huevos de <i>Oryzias latipes</i> por evento reproductivo, pero disminuye el número de desoves pro semana. La exposición crónica puede modificar el patrón de reproducción.
Kim <i>et al.</i> (2007)	Acetaminofen Carbamazepina Diltiazem Sulfonamida	Encontraron que <i>D. magna</i> es más susceptible que <i>D. longispira</i> . El diltiazem es el más tóxico (CL 8.2 mg/L en daphnidos) La concentración de los fármacos va de 0.14 - 16.5 $\mu\text{g/L}$ en el medio ambiente.
Khetan y Collins (2007)	AAS	Estudiaron la toxicidad aguda en <i>D. magna</i> , a 48 horas la $CE_{50}$ es de 88.1 mg/L, también realizaron la prueba de inhibición de crecimiento con el alga verde <i>D. Subspicatus</i> a 3 días reportándose la $CE_{50}$ de 106.7 mg/L.

Continúa...

Autor (Año)	Medicamento	Conclusión
Hayashi <i>et al.</i> (2008)	Ibuprofeno	Realizaron una exposición de 10 días en <i>D. magna</i> , encontraron que en la mayor concentración la descendencia es menor, dando 10 días de recuperación la descendencia es igual al control, ya que se recuperan teniendo descendencia más rápido.
Quinn <i>et al.</i> (2008)	Farmacéuticos	Realizaron un ensayo de regeneración de <i>Hydra attenuata</i> para conocer el potencial teratogénico de 10 fármacos identificados de un efluente de una PTAR. Se inhibió la regeneración con concentraciones de 1, 5 y 1 mg/L de gemfibrozil, ibuprofeno y naproxeno, y concentraciones más altas de 50 mg/L para bezafibrato y trimetropin. Carbamacepina y antibióticos (sulfapiridina, oxitetraciclina y novobiocin) incrementan la regeneración a 25, 5, 50 y 50 mg/L respectivamente. Tienen potencial teratogénico: Gemfibrozil, Ibuprofeno, naproxeno y bezafibrato. El que tiene menor potencial es la carbamacepina.
Parolini <i>et al.</i> (2009)	Diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol	Encontraron que el potencial de citogenotoxicidad es mayor para el paracetamol, le sigue el diclofenaco y por último el ibuprofeno usando biomarcadores <i>in vitro</i> .
Quin <i>et al.</i> (2009)	Ibuprofeno, naproxeno, gemfibrozil, bezafibrato, carbamacepina, sulfapiridina, oxitetraciclina, novobiocin, trimetropin, sulfametoxazol.	Encontraron que los fármacos actúan aditivamente en una mezcla, con efectos subletales a concentraciones relevantes en el medio ambiente (ng/L a µg/L).
Yamamoto <i>et al.</i> (2009)	Acetaminofen, atenolol, carbamacepina, indometacina, ac.mefenámico, propranolol	Encontraron que la biodegradación es lenta (> 24 h) y depende del lugar de muestreo y el tiempo. Propanolol, indometacina e ifenpradil son fácilmente fotodegradados.
Marco Urrea <i>et al.</i> (2009)	Ibuprofeno, ácido mefenámico, carbamacepina.	El ibuprofeno es degradado a 1-hidroxiibuprofeno y 2-hidroxiibuprofeno por los hongos <i>Trametes versicolor</i> , <i>Irpex lacteus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Ganoderma lucidum</i> .

## 1.2. Concentraciones de aines en cuerpos de agua

Los estudios relativos a la detección de fármacos se han realizado mayormente en países como Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU), Alemania, Suiza, Dinamarca, Holanda y Francia, en zonas de alta densidad poblacional, aunque también se han detectado en el Mar del Norte y la Antártida (Fent *et al.*, 2006). En estos estudios fueron encontradas concentraciones por arriba de mg/L de antibióticos, hormonas, antihipertensivos y antiinflamatorios/analgésicos (Seiler, 2002; Carlsson *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2009). En el Valle de México, se encontraron concentracio-

nes considerables de fármacos como: trimetropina, claritromicina, clindamicina, eritromicina, metropolol, ibuprofeno, gemfibrozil, diclofenaco, sulfasalazina, bezafibrato y naproxeno (Siemens *et al.*, 2008).

Los AINES son de particular interés, debido a su amplio consumo y a que en algunos países, tales como México, no cuentan con una regulación apropiada para su venta, uso y desecho (Gómez-Oliván *et al.*, 2009). Estos fármacos tienen efectos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, siendo los miembros más comunes de este grupo de agentes terapéuticos el ácido acetilsalicílico, el paracetamol, el diclofenaco, el ibuprofeno y el naproxeno (Furst *et al.*, 2007). Además son de los fármacos detectados más frecuentemente en los cuerpos de agua a nivel mundial. Forman parte de los seis fármacos más vendidos en el mundo y usualmente se encuentran en cantidades significativas en los efluentes municipales (Parolini *et al.*, 2009). Esto ha sido comprobado mediante diversos estudios alrededor del mundo (tabla 2).

Tabla 2. Antecedentes de la presencia de AINES en ecosistemas acuáticos

Autor (Año)	Medicamento
Ferrari <i>et al.</i> (2003)	Midieron la ocurrencia en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en Francia, Grecia, Italia y Suiza de los fármacos carbamacepina, ácido clofibrico y diclofenaco, además hicieron bioensayos en bacterias, algas, microcrutáceos y peces encontrando que la carbamacepina es el más peligroso.
Asthon <i>et al.</i> (2004)	Investigaron la incidencia de 12 compuestos farmacéuticos y sus metabolitos en PTAR y agua superficial en el Reino Unido. Diez fueron detectados en muestras de PTAR de los que destacan las concentraciones de diclofenaco 424 ng/L e ibuprofeno 3086 ng/L.
Ferrari <i>et al.</i> (2004)	Encontraron que las concentraciones predecibles y las medidas en un efluente exceden los 10 ng/l para los fármacos: carbamacepina, ácido clofibrico, diclofenaco, ofloxacina, propanolol y sulfametoxazol, además que la toxicidad aguda es baja.
Zuccato <i>et al.</i> (2005)	En efluentes de Italia identificaron ofloxacina, furesemida, atenolol, hidrocortiazida, carbamacepina, ibuprofeno, bezafibrato, eritromicina y claritromicina.
Lindqvist <i>et al.</i> (2005)	Estudiaron el tratamiento del agua en 7 PTAR para ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco y bezafibrato. La remoción fue mayor para ibuprofeno (92% +/-8%) y menor para el diclofenaco (26% +/-17%), encontraron que en los ríos y puntos de descarga de estas PTAR las concentraciones son más bajas por estar más diluidas y a las concentraciones encontradas en el agua superficial no se encuentran riesgos de toxicidad aguda.
Stülten <i>et al.</i> (2008)	Analizaron 6 efluentes de PTAR y encontraron cantidades de diclofenaco y sus metabolitos: 4'-hidroxiciclofenaco y 5'-hidroxiciclofenaco a concentraciones de 0-0.6 mg/L de diclofenaco y de sus metabolitos de 1.3 - 3.3 mg/L.

Continúa...

Autor (Año)	Medicamento
Corneau <i>et al.</i> (2008)	Estudiaron la incidencia de fármacos en el efluente de una PTAR en Atlantic, Canadá. El naproxeno, ibuprofeno y la cafeína fueron los más predominantes. El naproxeno, ibuprofeno y el ácido salicílico se detectaron en rangos bajos de ng/l en aguas tratadas y no tratadas.
Letzel <i>et al.</i> (2009)	Encontraron diclofenaco en concentraciones mayores a 2200 ng/L en efluentes de Alemania, a estas concentraciones pueden ocurrir efectos adversos crónicos en las poblaciones de peces.

### 1.3 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Son sustancias químicas con efecto analgésico, antipirético y antiinflamatorio. El término no-esteroideo se refiere a que los efectos clínicos son similares a los de los corticoides pero no las acompañan las consecuencias secundarias que los caracterizan. Como analgésicos se diferencian por no pertenecer a la clase de los narcóticos y actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas.

Las prostaglandinas son las encargadas de producir la sensación de dolor, ya que potencian a las sustancias algésicas, como las bradisininas, que estimulan las terminaciones nerviosas de las fibras C. En ocasiones, cuando existe la presencia de inflamación esta sensibiliza los receptores del dolor a estímulos mecánicos o químicos que regularmente son indoloros. El dolor que acompaña a la inflamación y lesión tisular quizá sea consecuencia de la estimulación local de las fibras del dolor y a una mayor sensibilidad a él (hiperalgesia), en parte, como consecuencia de una mayor excitabilidad de las neuronas centrales de la médula espinal (sensibilización central) (Gómez-Moreno *et al.*, 2009).

Los AINE no modifican la hiperalgesia ni el dolor causado por la acción directa de las prostaglandinas, por lo cual se dice que los efectos analgésicos sí provienen de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Intervienen en la regulación del centro hipotalámico cuando la fiebre es causa por infección, lesión tisular, inflamación, rechazo de injerto y cáncer, donde hay formación de citocinas IL-1beta, IL6, interferón alfa, beta y factor de necrosis tumoral alfa. Cabe señalar que los AINE no influyen en la temperatura corporal a casusa de factores como ejercicio o incremento de la temperatura ambiental, ni tampoco inhiben la fiebre causada por las prostaglandinas, si estas se aplican de manera directa sin embargo, si inhiben la generada por agentes que estimulas la síntesis de IL1 y otras citocinas como ya se mencionó.

En la mayoría de los casos, los agentes que originan dolor y aumento de la temperatura también dan lugar a la inflamación, la cual presenta como signos característicos; eritema y edema espontáneos. La respuesta inflamatoria surge en tres fases diferentes, y cada una es medida por mecanismos distintos: fase transitoria aguda (vasodilatación local y mayor permeabilidad capilar), subaguda tardía (ocurre infiltración de leucocitos y fagocitos) y proliferativa crónica (se observa degradación y fibrosis tisular).

Los miembros más prolíficos de esta clase de medicamentos son el ácido acetilsalicílico, paracetamol (acetaminofen), ibuprofeno, naproxeno, entre otros (Katzung, 2007).

#### 1.4. Mecanismos de acción de los AINE

Los efectos antipiréticos y antiinflamatorios de los AINEs se deben al bloqueo de la síntesis de prostaglandinas en los centros termorreguladores del tálamo e hipotálamo y sus sitios periféricos blancos. Más aún, al disminuir la síntesis de prostaglandinas, previene también la sensibilización de los receptores del dolor a los estímulos tanto mecánicos como químicos. La acción analgésica es debido a la disminución de la síntesis de prostaglandinas, reprimiendo la sensación de dolor. Los AINEs se utilizan para tratar el dolor de intensidad baja a moderada en donde participa la inflamación. Debido a que la membrana de las células está formada por fosfolípidos, cualquier estímulo (lesiones, microorganismos o alérgenos) produce ácido araquidónico con la ayuda de la fosfolipasa, iniciando una cascada de acciones que resulta en la formación de prostaglandinas (causantes de la inflamación).

La generación de prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico, está mediada por la ciclooxigenasa presente alrededor de las articulaciones y sobre todo en la membrana interna del retículo endoplasmático. Esta enzima está presente de dos formas: una constitutiva (COX-1) e inducible (COX-2). Ambas enzimas son sensibles a la inhibición por los AINE.

#### 1.5. Datos de consumo

Como se mencionó, los AINE son un grupo heterogéneo de fármacos frecuentemente utilizados debido a sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas. Un estudio efectuado por Langman (1988) estimó que las prescripciones de AINE en EUA superaban los 100 millones

anuales, si se toma en consideración que los AINE son comercializados como especialidades farmacéuticas publicitarias, en 1999 se estimó que uno de cada 7 sujetos en los EUA toma un AINE diariamente (Bjorkman, 1999). En este mismo año en España se vendieron más de 31 millones de envases de AINE, excluyendo el ácido acetilsalicílico (Sistema Nacional de Salud, 2000) En el Reino Unido se prescriben 24 millones de recetas anuales, un 15% de su población mayor toma AINE y en 2004 fue el sexto grupo farmacológico más importante en volumen de ventas, actualmente se refiere que treinta millones de personas en el mundo consumen diariamente AINE (Salas *et al.*, 2007).

En México, y en particular en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), sistema de seguridad social que atiende a población empleada en el sector formal y que representa 40% de la población del país, se otorgan un número importante de consultas a pacientes que requieren AINE (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2006). Sin embargo, se carece de información real sobre el consumo de este tipo de medicamentos en el país debido principalmente a que se trata de fármacos de libre venta, son de amplio consumo y no cuentan con una regulación apropiada para su venta, uso y desecho (Gómez-Oliván *et al.*, 2009).

### 1.6. Bioindicadores (*Hyalella azteca*)

La sostenibilidad de cualquier sistema especialmente de los ecosistemas, requiere en su operación, de indicadores que puedan servir como herramientas de información para la evaluación de las consecuencias ambientales derivadas de las actividades sociales y económicas (Bittermann y Haberl, 1998; Vázquez *et al.*, 2006).

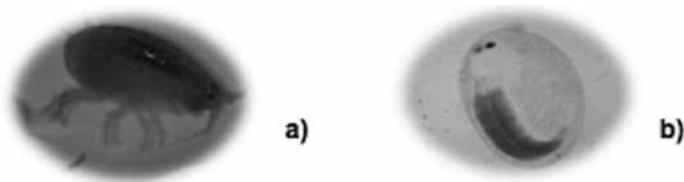
A una especie se le considera bioindicadora cuando es sensible a cambios en el medioambiente reflejándolos en la salud de sus poblaciones; éstas proveen información esencial y temprana que advierten de posibles daños en el ambiente, como son la presencia de patógenos infecciosos emergentes y contaminantes, lo que proporciona un rápido diagnóstico del riesgo (Godínez *et al.*, 2007).

En caso de la evaluación toxicológica del agua, el organismo centinela indicado es *Daphnia magna* o bien *Moina macrocopa*, por otra parte para la valoración de sedimentos se emplea a *Hyalella azteca* (Fournier *et al.*, 2001). En todos los casos, la utilización de seres vivos como indicado-

res del estado de ecosistemas acuáticos provee una información integral que permite respaldar la toma de decisiones en su manejo y control.

Las *Hyaella azteca* (figura 1) son organismos que presentan cuerpo pequeño (3 a 8 mm, los machos son más grandes que las hembras), tienen 2 o 3 dientes (como en una sierra y no en una boca) en la parte posterior del cuerpo. El segundo tramo de los machos es mucho más grande y más amplio que el de la hembra, en general son buenos nadadores. El color es variable (blanco, verde o marrón), se alimentan principalmente de algas filamentosas y diatomeas, pero también puede comer la materia orgánica en descomposición (Espina y Vanegas, 1996).

Figura 1. a) *Hyaella azteca* adulto, b) *Hyaella azteca* neonato



Debido a sus ventajas como indicador biológico, los científicos lo emplean como indicador de la calidad ambiental y del agua, así como de sedimentos debido a su alta sensibilidad a diversos xenobióticos, ya que son organismos bentónicos facultativos, pudiendo vivir tanto en la columna de agua como en los sedimentos superficiales (Galar, 2003; Brun *et al.*, 2006).

### 1.7. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la defensa antioxidante (Figura 6), que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan deterioro y muerte (Rodríguez *et al.*, 2001).

### 1.8. Radicales libres

Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una inestabilidad, alta reactividad y una gran capacidad de combinarse inespecíficamente con biomoléculas.

las como carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. Son producidos continuamente como parte del metabolismo normal de la célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de captura). Durante el proceso metabólico una pequeña parte (2-3%) de los radicales libres pueden evadir el mecanismo redox y causar daño oxidativo a los componentes celulares (Rodríguez *et al.*, 2001; Hangsber, 2002; Valavanidis *et al.*, 2006).

## 1.9. Especies reactivas de oxígeno

Se consideran especies reactivas de oxígeno (ERO) al oxígeno atómico (O), al ozono (O<sub>3</sub>), al oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del O<sub>2</sub>, al superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y al radical hidroxilo (·OH), estas últimas consideradas especies parcialmente reducidas. Las ERO en bajas concentraciones estimulan el crecimiento de las células, de algunas bacterias y otros microorganismos, además de que son indispensables para diferenciación celular y la muerte celular programada (Konigsberg, 2008).

El O<sub>2</sub> reacciona con la mayoría de los compuestos celulares, con la membrana plasmática, los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos muy cerca del sitio donde se forma. Interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos siendo el producto principal la 8-hidroxiguanidina (Konigsberg, 2008).

El O<sub>2</sub><sup>·-</sup> es a la vez un anión y un radical, se produce principalmente en la cadena respiratoria. Es tóxico para la célula porque a partir de él se puede originar el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Valavanidis *et al.*, 2006; Konigsberg, 2008).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se forma cuando uno de los dos electrones de O<sub>2</sub> se ha apareado con un electrón de giro contrario. Puede formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Es tóxico ya que puede formar <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y ·OH, aunado a la reacción con algunos metales de transición con los que se produce el radical ·OH el cual interacciona de forma irreversible con proteínas y DNA (Konigsberg, 2008).

El ·OH se produce principalmente por la reacción de Fenton. Es uno de los compuestos más reactivos que existen, puede oxidar tanto las bases púricas como las pirimídicas y también la desoxirribosa, además puede producir rupturas en el DNA. También reacciona con cualquier aminoá-

cido en el sitio que se origina, incluso con los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Otras fuentes endógenas de ERO dentro de las células son las enzimas oxidativas como triptófano dioxigenasa, xantino oxidasa y citocromo P450 reductasa, que pueden producir , mientras que la enzima guanidilciclasa y glucosa oxidasa generan peróxido de hidrógeno. Los contaminantes químicos son una fuente importante para la generación de ERO en los organismos, tal es el caso de los metales de transición, los herbicidas, las quinolonas y los componentes nitroaromáticos, ampliamente conocidos por su potencial para causar estrés oxidativo (2006).

## 2. Metodología

### 2.1. Obtención, cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba

El organismo de prueba (*Hyalella azteca*) se recolectó de su hábitat natural en la Laguna de San Miguel de Almaya, municipio de Capuluac, Estado de México y fue trasladado al laboratorio de Toxicología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, en bolsas de plástico con aireación constante.

Para su cultivo la *Hyalella azteca* fue mantenida en agua reconstituida ( $\text{NaHCO}_3 = 174 \text{ mg/L}$ ,  $\text{MgSO}_4 = 120 \text{ mg/L}$ ,  $\text{KCl} = 8 \text{ mg/L}$  y  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 120 \text{ mg/L}$ ) con un intervalo de pH 7.5 - 8.5, a temperatura ambiente, con oxigenación constante (6.4-6.6 mg/L  $\text{O}_2$ ) y fotoperiodos de 16 h luz/ 8 h oscuridad, fue alimentada *ad libitum* con lechuga molida. Los organismos empleados en los ensayos de toxicidad fueron neonatos de la tercera generación por reproducción sexual, de un cultivo de cuatro meses.

### 2.2. Preparación del sedimento artificial

La composición del sedimento artificial fue; 70 % arena (0.2 mm), 20 % caolinita (< 0.002 mm) y 10 % materia orgánica (0.2 mm). Se utilizó como fuente de materia orgánica composta de borrego, la cual fue inactivada por calor seco en un intervalo de temperatura de 55-60 °C durante un periodo de 3 días. El sedimento artificial fue esterilizado en autoclave durante 3 ciclos de 15 minutos a 121 °C y 15 lb de presión, con intervalos separados de una hora. Fue medido el pH con un potenciómetro cuando se prepararon los sistemas.

## 2.3. Determinación de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y estrés oxidativo

Los sistemas de prueba consistieron en recipientes de polietileno de 150 mL de capacidad, conteniendo agua reconstituida y sedimento artificial en una proporción de 3:1, provistos de oxigenación continua, fotoperiodos de 16h luz/ 8 h oscuridad y temperatura ambiente. Los sistemas de intoxicación fueron estáticos y no se proporcionará alimento a los organismos durante los periodos de exposición.

A fin de establecer la concentración destinada para la evaluación del estrés oxidativo, se determinó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico sobre *H. azteca*. Para ello, se utilizaron 5 sistemas de prueba, que se adicionaron con diferentes concentraciones de los fármacos ya mencionados, así como un sistema control libre de fármaco y se colocaron 10 organismos de prueba. El tiempo de exposición fue de 72 h y posteriormente se cuantificará el número de muertos (inmovilización).

Una vez establecida la CL<sub>50</sub> del diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico sobre *H. azteca*, se realizó el estudio de toxicidad subletal. A los sistemas de prueba se les adicionó una concentración correspondiente a 1/10 CL<sub>50</sub> de las mezclas binarias de diclofenaco con paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico, en forma de sedimento asimismo, se les agregaron 150 mg de *Hyalella azteca* (peso húmedo), los tiempos de exposición fueron de 72 h; después de los cuales, el organismo de prueba se separaron y se suspendieron en 1 mL de solución amortiguadora de tris pH 7. La mezcla se mantuvo en un baño de hielo durante todo el procedimiento y se homogenizó. El sobrenadante se centrifugo a 12500 rpm durante 15 min a -4° C. Posteriormente se evaluaron los siguientes biomarcadores: Grado de LPX, y contenido de CPO para valorar la concentración de proteínas oxidadas, así como la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX. Las pruebas bioquímicas se realizaron con el sobrenadante, excepto para evaluar el grado de lipoperoxidación en la que se empleó el paquete celular.

### 2.3.1. Determinación del grado de lipoperoxidación

La determinación de LPX se realizó mediante el método de Buege y Aust (1979). Se tomaron 100 mL de sobrenadante y se completaron a 1 mL con la solución amortiguadora Tris-HCl pH 7.4, se incubó a 37°C durante

30 min, se agregaron 2 mL del reactivo TCA-TBA (ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.375 % en ácido tricloroacético (TCA) al 15 %) y se agitó en un vórtex. Posteriormente se calentó a ebullición durante 45 min, se dejó enfriar y se removió el precipitado por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Se determinó la absorbancia de la muestra a 535 nm contra un blanco de reactivo. Se calculó la concentración de MDA por medio de su coeficiente de extinción molar ( $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 2.3.2. Determinación del contenido de proteínas carboniladas

La determinación del PCC se realizó utilizando el método Levine *et al.* (1994). Las proteínas solubles se obtuvieron por centrifugación de las muestras a 12500 rpm durante 15 min a  $-4^\circ\text{C}$ . A 100  $\mu\text{L}$  de este sobrenadante se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de 10mM DNPH/2M HCl, antes de la incubación a temperatura ambiente durante 1 h en la oscuridad. Posteriormente, se le adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 20% y se dejó reposar (15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ ). A continuación, ésta se centrifugo a 11000 rpm durante 5 min. El botón se enjuago tres veces con etanol-acetato de etilo 1:1, se disolvió en 1 mL de una solución de 6M guanidina pH 2.3 y se incubo a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. La absorbancia fue leída a 366 nm y los resultados se expresarán en mM o nM de carbonilos reactivos (C=O)/mg proteínas, sobre la base de su coeficiente de extinción molar de  $21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

### 2.3.3. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

La determinación de la actividad de la SOD se realizó mediante el método de Misra y Fridorich, 1972. Se adicionaron 40  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a una celda de 1 cm, se agregaron 260 $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM de EDTA) a pH 10.2 y 200  $\mu\text{L}$  de adrenalina 30 mM. Se determinó la absorbancia a 480 nm a los 30 s y 5 min. La actividad de la SOD se determinó por medio del su coeficiente de extinción molecular ( $21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 2.3.4. Determinación de la actividad de la catalasa

La determinación de la actividad de la CAT se realizó mediante el método de Radi *et al.*, (1991). Se tomaron 20 mL del sobrenadante y se le agrego 1 mL de la solución amortiguadora de aislamiento (0.3 M de sacarosa, 1 mM de EDTA, 5 mM de HEPES y 5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 0.2 mL de la solución de peróxido de hidrógeno 20 mM, se determinó la absorbancia a 240

nm, a 0 y 60 s. Los resultados se obtuvieron sustituyendo la absorbancia de ambos tiempos en la siguiente fórmula: (Concentración de catalasa =  $(A_0 - A_{60})/CEM$ ). Donde el CEM del  $H_2O_2$  equivale a  $0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; los datos se expresaron en mM de  $H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}$  de tejido húmedo<sup>-1</sup>.

### 2.3.5. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa

La actividad de GPx se determinó mediante el método de Gunzler y Flohe-Clairborne, 1985, modificado por Stephensen *et al.*, 2000. A 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante se añaden 10  $\mu\text{L}$  de glutatión reductasa (2 U de glutatión reductasa) se le adicionaron 290  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de reacción ( $K_2HPO_4$  50mM,  $KH_2PO_4$  50mM (pH7.0), glutatión reducido 3.5 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.12mM) y 100  $\mu\text{L}$  de  $H_2O_2$  0.8 mM. La absorbancia fue leída a 340 nm después de 0 y 60 s. La actividad de la enzima se calculó utilizando la siguiente ecuación; (Concentración de glutatión peroxidasa =  $(A_0 - A_{60})/CEM$ ). Donde el CEM del NADPH =  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; los datos fueron expresados en mM de NADPH/min/g tejido húmedo.

## 3. Resultados

### 3.1. Toxicidad aguda del diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico a las 72 horas sobre *Hyalella azteca*

Se presentan los resultados de  $CL_{50}$  (tabla 3), donde los organismos tratados presentaron disminución de movilidad, pérdida de la coloración característica, seguido por la inmovilización total y contracción del cuerpo formando un semicírculo.

Tabla 3. Concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de AINE

Fármaco	* $CL_{50}$ (mg/Kg)	**IC 95%	***ID
Ibuprofeno	1.7	1.25-2.729	1.2-2.7
Ácido acetilsalicílico	2.6	2.348- 2.867	2.5-3.2
Diclofenaco	4.6	3.4-5.7	4.2-27.0
Naproxeno	7.6	6.4-8.1	2.5-9.5
Paracetamol	7.7	4.770-17.055	2.4-15.1

\* Concentración Letal Media, \*\*Intervalo de Confianza, \*\*\*Intervalo de Dosis. Las concentraciones fueron obtenidas mediante el programa computarizado de análisis PROBIT EPA, versión 1.5.

Las condiciones que se consideraron para llevar a cabo las determinaciones de efecto de los AINE se presentan a continuación (tabla 4).

**Tabla 4. Condiciones del estudio subletal para determinar los efectos de los fármacos sobre *Hyalella azteca***

Condición	Parámetros
Volumen de los recipientes de prueba	150 mL
Volumen de prueba	10 g sedimento artificial y 30 mL de agua sintética
Número de organismos por prueba	150 mg
Temperatura	20°C +/- 2°C
Agua de dilución	Agua semidura
Iluminación	Fotoperiodos de 16 h luz y 8 h oscuridad
Duración del bioensayo	72 h
Tipo de ensayo	Estático, sin renovación del medio

### 3.1.1. Discusión de datos de toxicidad aguda

Como se menciona en los antecedentes, actualmente los medicamentos se han convertido en una fuente importante de contaminación en el medio acuático a nivel mundial (Spindler *et al.*, 2007; Montforts *et al.*, 2007). Muchos de estos compuestos son tóxicos y causan daños letales o crónicos en los hidrobiontes.

Siendo así que la concentración letal media varía dependiendo a las características propias de los fármacos en este caso los AINE utilizados, pudiéndose observar en los resultados que el ibuprofeno presenta la concentración letal media más baja y el paracetamol la más alta; teniendo como referente la clasificación de la toxicidad de productos farmacéuticos en el ambiente acuático realizada por Jones *et al.* (2002), quien reporta que produce efectos dañinos en peces y crustáceos.

El interés de conocer los efectos ecológicos debido a la presencia de los medicamentos en el medio ambiente acuático, surgió como resultado de un crecimiento gradual en el número de reportes de presencia de fármacos en bajas concentraciones en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y superficiales, y en menor proporción, en las de tipo subterráneas, potables y sedimentos.

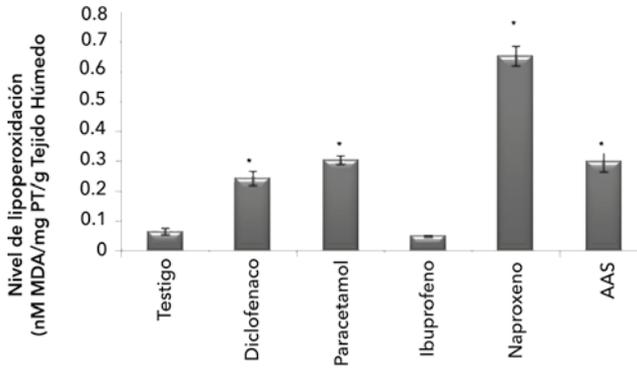
La respuesta de los organismos a los contaminantes es valorada con "bioensayos". Una de las ventajas que presentan estas pruebas es el empleo bajo condiciones rigurosamente controladas que puede establecer una relación causal entre la exposición al agente y el efecto producido de forma concluyente. Además, es posible identificar el mecanismo de acción de los tóxicos por el análisis del daño producido tanto a los animales de ensayo como a sus tejidos (Moreno, 2003). Los niveles de toxicidad están en función directa de las concentraciones de xenobiótico que se alcancen en los tejidos del organismo; se relacionan con la concentración del compuesto en el medio, la cual a su vez depende, tanto del tipo de contaminante, como del organismo y del tiempo de exposición (Espina y Vanegas, 1996). Los bioensayos se llevan a cabo en especies aisladas que se eligen considerando su distribución geográfica, su importancia ecológica y económica, la duración de su ciclo de vida, su talla máxima, así como la sensibilidad de su respuesta (O'Connor, 1994). Existen varios tipos de estudios de toxicidad en función del tiempo de exposición y las concentraciones probadas: ensayos de toxicidad aguda y subletal (subaguda, subcrónica y crónica). Además se realizan pruebas especiales para determinar el posible cambio funcional y estructural ocasionado por tal exposición.

En la primera etapa de este proyecto se determinó la toxicidad aguda ( $CL_{50}$ ) a las 72 horas en las condiciones presentadas, obteniendo los siguientes resultados; 1.7 mg/Kg para ibuprofeno, 2.6 mg/Kg para AAS, 4.6 mg/Kg para diclofenaco, 7.6 mg/Kg para naproxeno y de 7.7 mg/Kg para paracetamol. Siendo los resultados de toxicidad aguda sobre *Hyalomma azteca* explicados debido a que se conoce que los AINE actúan bloqueando a la enzima ciclooxigenasa la cual es responsable de catalizar la reacción de ácido araquidónico para la producción de prostaglandinas (Roberts y Morrow, 2001). Se sabe además, que estos mediadores celulares están involucradas en una gran variedad de funciones fisiológicas en anfibios, incluyendo su papel en la neurotransmisión y en el transporte de iones a través de las membranas celulares. Estos mecanismos fueron los que posiblemente produjeron la muerte de los organismos de prueba. Asimismo en la observación de *Hyalomma azteca* en las 72 horas de exposición a los fármacos presentaban una coloración blanquecina con respecto al testigo, además de una disminución en la movilidad posiblemente al no haber un buen proceso de transmisión neuronal.

### 3.2. Resultados de estrés oxidativo

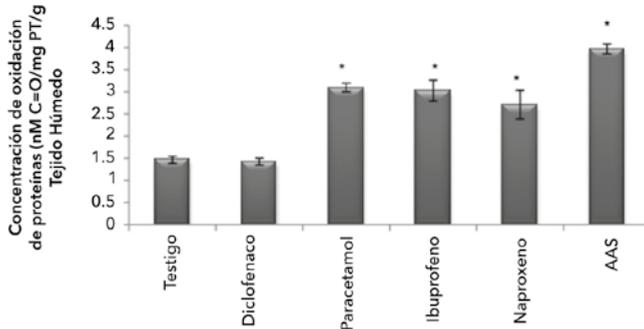
En la segunda etapa de este proyecto se evaluó el estrés oxidativo a través de la determinación del grado de lipoperoxidación (figura 2), proteínas oxidadas (figura 3) y las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa (figura 4), catalasa (figura 5) y glutatión peróxidasa (figura 6), exponiendo a los organismos a 1/10  $Cl_{50}$  para observar el cambio ocasionado por los fármacos y los resultados se presentan en los siguientes gráficos:

Figura 2. Grado de lipoperoxidación en *H. azteca* expuesta a AINE



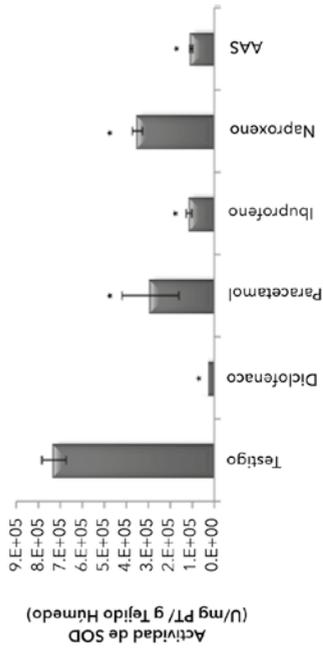
(\*) indica diferencia estadística,  $p < 0.05$  con respecto al testigo

Figura 3. Concentración de proteínas oxidadas en *H. azteca* expuesta a AINE



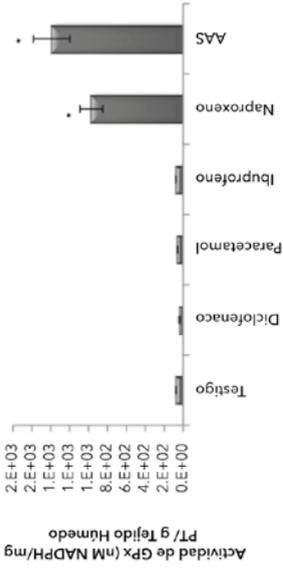
(\*) indica diferencia estadística,  $p < 0.05$  con respecto al testigo.

Figura 4. Actividad de SOD en *H. azteca* expuesta a AINE



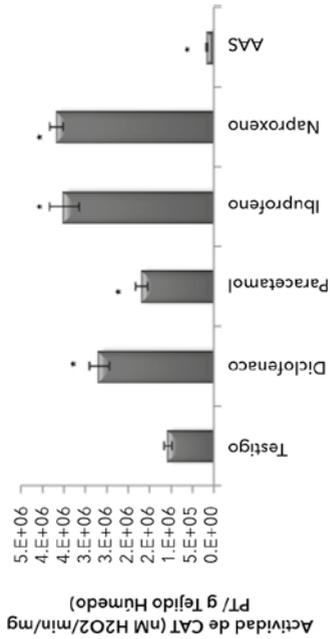
(\*) indica diferencia estadística,  $p < 0.05$  con respecto al testigo.

Figura 6. Actividad de GPX en *H. azteca* expuesta a AINE



(\*) indica diferencia estadística,  $p < 0.05$  con respecto al testigo.

Figura 5. Actividad de CAT en *H. azteca* expuesta a AINE



(\*) indica diferencia estadística,  $p < 0.05$  con respecto al testigo.

### 3.2.1. Discusión de datos de estrés oxidativo

Muchos contaminantes, entre ellos los medicamentos pueden ejercer un efecto tóxico relacionado con el estrés oxidativo, producto de la toxicidad del oxígeno donde la citotoxicidad de las especies reactivas de oxígeno y los radicales de oxígeno son capaces de reaccionar con macromoléculas celulares, ocasionando inactivación enzimática, lipoperoxidación (LPOX), daño genotóxico al ácido desoxirribonucleico (ADN) y muerte celular (Wills, 1987).

La lipoperoxidación es un proceso complejo que involucra la formación de radicales lipídicos entre el oxígeno molecular y los ácidos grasos insaturados (Di Giulio *et al.*, 1989; Porter *et al.*, 1995); la propagación de éstos, aunado al rearrreglo de las dobles ligaduras en los lípidos insaturados, dan origen a dienos conjugados y productos carbonilos de la peroxidación (cetonas, esterés, alcoholes, y aldehídos) siendo difundidos fuera del sitio de producción (daño indirecto). Así como a la destrucción de los lípidos membranosos produciendo una pérdida en la fluidez de la membrana permitiendo la liberación de productos reactivos siendo este un daño directo (Sevanian y McLeod, 1997; Díaz *et al.*, 1998).

Los datos presentados en esta investigación con los biomarcadores grado de lipoperoxidación y proteínas oxidadas (figuras 2 y 3), muestran que existe daño oxidativo, lo cual supone que una fracción de los radicales libres generados en *Hyalella azteca*, son capaces de alcanzar sus dianas moleculares antes de que puedan ser eliminados por mecanismos antioxidantes. Sin embargo, la mayor parte de los radicales libres -al menos en muchas partes de la célula- son eliminados mediante antioxidantes. De hecho, el mantenimiento de la homeostasis redox del tejido sólo es posible mediante un equilibrio entre la intensidad de generación y eliminación de radicales libres. Este equilibrio, se puede dar con altos niveles de generación y destrucción, y viceversa como ocurre en las distintas especies animales. También se dan dentro de una misma especie en distintas condiciones. Así, cuando aumenta la producción de radicales libres debido a causas exógenas o endógenas se puede dar una regulación compensadora a la alza en las defensas antioxidantes (figuras 4, 5 y 6). Cuando este equilibrio entre generación y destrucción de radicales libres se ve alterado la célula entra en un proceso degradativo a patológico.

Los sistemas de defensa que tienden a inhibir la formación de oxirradicales incluyen enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRED), que participan principalmente en la detoxificación de radicales en moléculas no reactivas. Otros antioxidantes de bajo peso molecular son GSH,  $\beta$ -caroteno (vitamina B), ascorbato (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y ubiquinol (Barja, 1996).

La SOD pertenece al grupo de la metaloenzimas que catalizan la conversión de aniones superóxido reactivos ( $O_2^-$ ) para originar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) el cual es una importante especie reactiva de oxígeno (Keller *et al.*, 1991). El  $H_2O_2$  es subsecuentemente detoxificado por dos enzimas: CAT y GPOX. La SOD se encuentra presente en todos los organismos aeróbicos por lo que se considera fundamental en la ruta antioxidante. Además la velocidad de SOD para catalizar el  $O_2^-$  dismutado, cerca de limitar la difusión, la hace una de las enzimas más activas.

La CAT es una enzima que se encuentra contenida en la hematina, facilita la remoción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual es metabolizado a  $O_2$  y agua. A diferencia de algunas peroxidasa que reducen varios lipoperóxidos como el  $H_2O_2$ , CAT puede únicamente reducir  $H_2O_2$ . Las CAT se localizan en los peroxisomas de la mayoría de las células y están involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos.

Las peroxidasa son enzimas que reducen una variedad de peróxidos a sus correspondientes alcoholes. Mientras CAT emplea una molécula de  $H_2O_2$  como dador en la reducción de otra molécula  $H_2O_2$ , las peroxidasa utilizan otros reductores. GPx cataliza el metabolismo de  $H_2O_2$  en agua, involucrando una oxidación concomitante de glutatión reducido (GSH) a su forma oxidada (GSSG). GPx son considerados importantes en la protección de membranas a daño debido a lipoperoxidación (Winkler *et al.*, 1994).

Al observar en los gráficos de SOD, CAT y GPx (figuras 4, 5 y 6) que existe una alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes como producto de los cambios ocasionados por la presencia de AINEs. Siendo así que causa preocupación la presencia tanto de los AINES debido a que causan cambios importantes en los organismos a lo largo de la cadena trófica, lo cual en un futuro no muy lejano estará afectando a los humanos como consecuencia de la dinámica de los xenobióticos (farmacéuticos) en el ambiente.

#### 4. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio de toxicidad aguda y a la clasificación europea, que considera peligroso ambientalmente a aquellos fármacos cuya concentración letal media sea menor a 100 mg/L, los AINE; diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico, pueden ser considerados dañinos para los ecosistemas acuáticos.

Los AINE (diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico) son capaces de producir estrés oxidativo sobre *Hyaella azteca*, reflejándose en los incrementos de lipoperoxidación y del contenido de proteínas carboniladas, y en los cambios producidos en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx.

#### 5. Referencias

- Albert, L., Namihira, D. (2004). Conceptos básicos en ecología y su relación con la toxicología ambiental" y "Contaminación ambiental y criterios de evaluación. *Toxicología ambiental*. Universidad de la Ciudad de Juárez. Chihuahua, México, pp. 52-54, 154-160.
- Araújo, J., Gonzalez, E., Egea, M.A., Garcia, M.L., Souto, E.B. (2009). Nanomedicines for Ocular NSAIDs: Safety on Drug Delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 5 (4): 394-401.
- Ashton, D., Hilton, M. y Thomas, K. (2004). Investigating the Environmental Transport of Human Pharmaceuticals to Streams in the United Kingdom". *Sci. Total Environ*. 33: 131-140.
- Barja, G. (1996). Los Radicales Libres mitocondriales como factores principales determinantes de la velocidad del envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 31 (3): 153-161.
- Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R. y Loge, F.J. (2005). Occurrence and Fate of Pharmaceutically Active Compounds in the Environment, a Case Study: Høje River in Sweden. *J Hazard Mater*. 122 (3): 195-204.
- Bittermann, W., Haberl, H. (1998). Landscape-Relevant Indicators for Pressures on the Environment. *Innov Eur J Soc Sci Res*. 11 (1): 87-106.

- Bjorkman, D.J. (1999). Current Status of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID) Use in the United States: Risk Factors and Frequency of Complications. *Am J Med.* 107: S3-S10.
- Brun, L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P. y Lee, H. (2006). Pharmaceutically Active Compounds in Atlantic Canadian Sewage Treatment Plant Effluents and Receiving Waters and Potential for Environmental effects as Measured by Acute and Chronic Aquatic Toxicity. *Environ. Toxicol, Chem.* 26 (8): 2163-2176.
- Büege, J.A., Aust, S.D. (1979). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
- Burger, J. y Gochfeld, M., 2004. Marine Birds as Sentinels of Environmental Pollution. *EcoHealth.* 1 (3): 263-274.
- Carlsson, C., Johansson, A.K., Alvan, G., Bergman, K., Kühler, T. (2006). Are Pharmaceuticals Potent Environmental Pollutants?: Part I: Environmental Risk Assessments of Selected Active Pharmaceutical ingredients". *Sci. Total Environ.* 364(1): 67-87.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture Toxicity of the Anti-Inflammatory Drugs Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, and Acetylsalicylic Acid. *Ecotox Environ Safe.* 59 (3): 309-315.
- Corneau, F., Surette, C., Brun, G.L. y Losier, R. (2008). The Occurrence of Acidic Drugs and Caffeine in Sewage Effluents and Receiving Waters from Three Coastal Watersheds in Atlantic Canada. *Sci. Total Environ.* 396 (2-3): 132-46.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G. W. y Jewell, C.S. (1989). Biochemical Responses in Aquatic Animals: a Review of Determinants of Oxidative Stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8 (12): 1103-1123.
- Díaz, J., Sánchez, M.J. y Navarro, A. (1998). Peroxidación lipídica en neonatología. *Pediátrica.* 8 (6): 221-232.
- Espina, S. y Vanegas, C. (1996). Ecotoxicología y Contaminación En: A. V. Botello, J. L. Rojas Galaviz, J. A. Benítez y D. Zárate Lomelí (Eds.) *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias.* EPOMEX, pp. 69-106.

- Felis, E., Marciocha, D., Surmacz-Gorska, J. y Miksch, K. (2007). Photochemical Degradation of Naproxen in the Aquatic Environment". *Water Sci. Technol.* 55 (12): 281-286.
- Fent, K., Weston, A.A. y Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76 (2): 122-159.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo-Giudice, R., Pollio, A. y Garric, J. (2004). Environmental Risk Assessment of Six Human Pharmaceuticals: Are the Current Environmental Risk Assessment Procedures Sufficient for the Protection of the Aquatic Environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(5): 1344-1354.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Lo-Giudice R., Pollio, A. y Garric, J. (2003). Ecotoxicological Impact of Pharmaceuticals Found in Treated Wastewaters: Study of Carbamazepine, Clofibric Acid, and Diclofenac". *Ecotox. Environ. Safe.* 55 (3): 359-370.
- Flippin, J.L., Huggett, D. y Foran, C.M. (2007). Changes in the Timing of Reproduction Following Chronic Exposure to Ibuprofen in Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 81 (1): 73-78.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y. y Brousseau, P. (2001). Effects of in Vivo Exposure of *Mya Arenaria* to Organic and Inorganic Mercury on Phagocytic Activity of Hemocytes. *Toxicology.* 161(3): 201-211.
- Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Burmester, G.R., Sieper, J. y Weinblatt, M.E. (2007). Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2007. *Ann Rheum Dis*, 66 (suppl. 3): iii2-iii22.
- Galar M. (2003). *Estudio comparativo del efecto tóxico producido por zinc sembrado en sedimentos de la presa Ignacio Ramírez en tres sistemas aislados y en microcosmo de tres organismos bentónicos*. Tesis doctoral. ENCB, IPN. México D.F.
- Gagné, F., Blaise, C., André, C. (2005). Occurrence of Pharmaceutical Products in a Municipal Effluent and Toxicity to Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Hepatocytes. *Ecotox. Environ. Safe.* 64: 329-336.
- Godínez, C., Santos del Prado, K., Zepeda, H., Aguirre, A., Anderson, D. (2007). Monitoreo de poblaciones y condición de salud de aves marinas y lobos marinos en la isla del Norte del Golfo de Cali-

- fornia, México. *Gaceta ecológica*. Instituto Nacional de Ecología: 240-267.
- Gómez-Moreno, G., Guardia, J., Cutando, A. y Calvo-Guirado, J.L. (2009). Pharmacological Interactions of Anti-Inflammatory-Analgesics in Odontology. *Med Oral Patol. Oral Cir. Bucal*. 14 (2): E81-E89.
- Gómez-Oliván, L.M., Carmona-Zepeda, F.A., Galar-Martínez, M., Téllez-López, A.M., Amaya-Chávez, A. (2009). Estudio de automedicación en una farmacia comunitaria de la ciudad de Toluca. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 40 (1): 5-11.
- Gravel, A. y Vijayan, M.M. (2007). Salicylate Impacts the Physiological Responses to an Acute Handling Disturbance in Rainbow Trout". *Aquat. Toxicol.* 85 (2): 87-95.
- Gunzler, W., Flohe-Clairborne, A. (1985). Glutathione Peroxidase. En: R. A. Green-Wald (Ed.). *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton: CRC Press. 285-290.
- Hangsber, W. (2002). *Biología de las especies de oxígeno reactivas*. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F, pp. 19-54.
- Hayashi, Y., Heckmann, L.H., Callaghan, A. y Sibly, R.M. (2008). Reproduction Recovery of the Crustacean *Daphnia Magna* after Chronic Exposure to Ibuprofen. *Ecotoxicology*. 17 (4): 246-51.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (2006). Información estadística en salud. *Consultas de Medicina Familiar*. Artículo en línea, disponible en: [http://www.imss.gob.mx/dpm/dties/Celula.aspx?ID=SC06\\_00\\_00\\_01\\_06&OPC=opc07&SRV=A2006](http://www.imss.gob.mx/dpm/dties/Celula.aspx?ID=SC06_00_00_01_06&OPC=opc07&SRV=A2006). Consultado el 28 de junio de 2011.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtiera, L. y Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of Naproxen and Its Phototransformation Products". *Sci. Total Environ.* 348 (1-3): 93-101.
- Jones, O.A., Voulvoulis, N. y Lester, J.N. (2002). Aquatic Environmental Assessment of Top 25 English Prescription Pharmaceuticals. *Water Res.* 36 (20): 5013-5022.
- Katzung, B., (2007). Farmacología Básica y Clínica. *Manual Moderno*. 9ª ed. México.

- Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S., Hallewell, R.A. (1991). Cu, Zn Superoxide Dismutase is a Peroxisomal Enzyme in Human Fibroblasts and Hepatoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (16): 7381-7385.
- Khetan, S.K. y Collins, T.J. (2007). Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: a Challenge to Green Chemistry". *Chem. Rev.* 107 (6): 2319-2364.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.G. y Park, J. (2007). Aquatic Toxicity of Acetaminophen, Carbamazepine, Cimetidine, Diltiazem and Six Major Sulfonamides, and Their Potential Ecological Risks in Korea". *Environ. Int.* 33 (3): 370-375.
- Konigsberg, M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas. El Manual Moderno.* México, D.F.
- Kosjek, T., Heath, E., Krbavcic, A. (2005). Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAIDs) Residues in Water Samples. *Environ. Int.* 31 (5): 679-685.
- Langman, M. (1988). Ulcer Complications and Nonsteroidal Antinflammatory Drugs. *Am. J. Med.* 84 (2A): 15-9.
- Larsen, T.A., Lienert, J., Joss, A. y Siegrist, H. (2004). How to Avoid Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. *J. Biotechnol.* 113 (1): 295-304.
- Letzel, M., Metzner, G., Letzel, T. (2009). Exposure Assessment of the Pharmaceutical Diclofenac Based on Long-Term Measurements of the Aquatic Input. *Environ Int.* 35(2): 363-368.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R. y Shacter, E. (1994). Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.* 233: 346-357.
- Lin, A.Y. y Reinhard, M. (2005). Photodegradation of Common Environmental Pharmaceuticals and Estrogens in River Water". *Environ. Toxicol Chem.* 24 (6): 1303-1309.
- Lindqvist, N., Tuhkanen, T. y Kronberg, L. (2005). Occurrence of Acidic Pharmaceuticals in Raw and Treated Sewages and in Receiving Waters". *Water Res.* 39 (11): 2219-2228.

- Madden, J.C., Enoch, S.J., Hewitt, M. y Cronin, M.T. (2009). Pharmaceuticals in the Environment: Good Practice in Predicting Acute Ecotoxicological Effects". *Toxicol. Lett.* 185(2): 85-101.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T. y Caminal, G. (2009). Ability of White-Rot Fungi to Remove Selected Pharmaceuticals and Identification of Degradation Products of Ibuprofen by *Trametes Versicolor*". *Chemosphere.* 74 (6): 765-772.
- Marques, C.R., Abrantes, N., Gonçalves, F. (2004a). Life-History Traits of Standard and Autochthonous Cladocerans: II. Acute and Chronic Effects of Acetylsalicylic Acid Metabolites". *Environ. Toxicol*, 19 (5): 527-540.
- Marques, C.R., Abrantes, N. y Gonçalves, F. (2004b). Life-History Traits of Standard and Autochthonous Cladocerans: I. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid". *Environ Toxicol*, 19 (5): 518-526.
- Misra, H.P., Fridovich, I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Super-Oxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 247 (10): 3170-3175.
- Montforts, M.H., Brandt, I. y Hutchinson, T.H. (2007). Summary of Workshop on Environmental Assessment of Human Medicines: Development and Use of Aquatic Toxicity Data. *Drug Inf. J.* 41 (2): 203-209.
- Moreno, G. (2003). *Toxicología ambiental evaluación de riesgo para la salud humana*. España: McGraw Hill.
- O'connor, D. (1994). Toxic Pollution and Its Impact on Receiving Waters. En: Novorty V., Olem H. *Water. Quality Prevention Identification and Management of diffuse Pollution*. Nueva York: Van Nostrand Reinhold, pp. 1054.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D. Riva, C. y Provini, A. (2009). An Invitro Biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS)". *Toxicol Vitro*, 23(5): 935-942.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E. y Mills, K.A. (1995). Mechanisms of Free Radical Oxidation of Unsaturated Lipids. *Lipids*, 30 (4): 277-290.

- Quinn, B., Gagné, F. y Blaise, C. (2008). The Effects of Pharmaceuticals on the Regeneration of the Cnidarian, *Hydra attenuate*. *Sci. Total Environ.* 402 (1): 62-69.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C. (2009). Evaluation of the Acute, Chronic and Teratogenic Effects of a Mixture of Eleven Pharmaceuticals on the Cnidarian, *Hydra attenuate*. *Sci. Total Environ.* 407 (3): 1072-1079.
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D. y Freeman, B.A. (1991). Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266 (32): 22028-22034.
- Richards, S., Cole, S. (2006). A Toxicity and Hazard Assessment of Fourteen Pharmaceuticals to *Xenopus Laevis* Larvae. *Ecotoxicol.* 15: 647-656.
- Richards, S.M., Wilson, C.J., Johnson, D.J., Castle, D.M., Lam, M., Mabury, S.A., Sibley, P.K. y Solomon, K.R. (2004). Effects of Pharmaceutical Mixtures in Aquatic Microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (4): 1035-1042.
- Roberts, L.J., Morrow, J.D. (2001). Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory Agents and Drugs Employed in the Treatment of Gout. *Pharmacological Basis of Therapeutics.* 9 ed. Nueva York: McGraw-Hill, pp. 687-731.
- Rodríguez, J.M., Menéndez, J.R., Trujillo, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar.* 30 (1): 15-20.
- Salas, M.M, Llanos, A.A, Salazar, Y.X. y Pérez, P.B. (2007). Consumo de anti-inflamatorios no esteroideos en atención primaria en Costa Rica: evolución y variabilidad geográfica. *Gac. Sanit.* 21 (6): 458-464.
- Schreiber, F., Szewzyk, U. (2008). Environmentally Relevant Concentrations of Pharmaceuticals Influence the Initial Adhesion of Bacteria. *Aquat. Toxicol.* 87 (4): 227-233.
- Seiler, J.P. (2002). Pharmacodynamic Activity of Drugs and Ecotoxicology—Can the Two Be Connected? *Toxicol. Lett.* 131 (1): 105-115.
- Sevanian, A. y Mcleod, L. (1997). Formation of Biological Reactivity of Lipid Peroxidation Products. *Free Radical Toxicology.* Taylor and Francis, Washington DC, pp. 47-70.

- Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C. y Kaupenjohann, M. (2008). Concentrations and Mobility of Human Pharmaceuticals in the World's Largest Wastewater Irrigation System, Mexico City-Mezquital Valley. *Water Res*, 42(8): 2124-2134.
- Sistema Nacional de Salud (2000). *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Monografía en línea, disponible en: <https://www.msssi.gob.es>
- Snyder, E.M., Pleus, R.C. y Snyder, S.A. (2005). Pharmaceuticals and EDCs in the US Water Industry—an Update. *J. Am. Water Works Assoc*, 97 (11): 32-36.
- Spindler, P., Montforts, M., Olejniczak, K., Koschorreck, J., Vidal, J.M., Johansson, A.K. y Van der Laan, J.W. (2007). Environmental Assessment for Human Medicines in the European Union. *Drug Inf. J.* 41 (2): 149-153.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson- Erics, M. y Förlin, L. (2000). Biochemical Indicators of Pollution Exposure in Shorthorn Sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), Caught in Four Harbours on the Southwest Coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48 (4): 431-442.
- Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L.P., Lützhøft, H.C. y Halting-Sørensen, B., (2000). Environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals in Denmark after Normal Therapeutic Use. *Chemosphere*, 40(7): 783-793.
- Stülten, D. Zühlke. S., Lamshöft, M. y Spiteller, M. (2008). Occurrence of Diclofenac and Selected Metabolites in Sewage Effluents. *Sci. Total Environ.* 405 (1-3): 310-316.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., y Scoullou, M. (2006). Molecular Biomarkers of Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Toxic Environmental Pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 64 (2): 178-189.
- Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M. J., Esteban, E., Peñalosa, J. M. y Carpena, R. (2006). Use of White Lupin Plant for Phytostabilization of Cd and as Polluted Acid Soil. *Water Air Soil Pollut.* 177: 349-365.

- Wills, E. (1987). Evaluation of Lipid Peroxidation in Lipids and Biological Membranes. En: Snell, K., Mullock, B (Eds.). *Biochem Toxicol. A Practical Approach*. Estados Unidos: IRL Press, pp. 127-150.
- Winkler, B.S., Orselli, S.M. and Rex, T.S., 1994. "The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective". *Free Radic Biol Med*, 17: 333-349.
- Yamamoto, H., Hayashi, A., Nakamura, Y., Sekizawa, J. (2005). Fate and Partitioning of Selected Pharmaceuticals in Aquatic Environment. *Environ. Sci.* 12 (6): 347-58.
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A. y Sekizawa, J. (2009). Persistence and Partitioning of Eight Selected Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Laboratory Photolysis, Biodegradation, and Sorption Experiments. *Water Res*, 43 (2): 351-362.
- Zhang, Y., Geissen, S.U. y Gal, C. (2008). Carbamazepine and Diclofenac: Removal in Wastewater Treatment Plants and Occurrence in Water Bodies. *Chemosphere*, 73 (8): 1151-1161.
- Zuccato, E., Castiglioni, S. y Fanelli, R. (2005). Identification of the Pharmaceuticals for Human Use Contaminating the Italian Aquatic Environment. *J. Hazard Mater.* 122 (3): 205-209.

