



**Universidad Autónoma del Estado de México**

**Facultad de Química**

Programa

Maestría en Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

**“Influencia de un alimento funcional enriquecido con  
espirulina sobre la embriotoxicidad y teratogenicidad  
inducidas por tetraciclina sobre *Danio rerio*”**

**Tesis que para obtener el grado de Maestra en  
Ciencias y Tecnología Farmacéuticas**

**LBT. Paulina Tenorio Chávez**

**Comité tutorial:**

**Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván**

**Dra. María Dolores Hernández Navarro**

**Dra. Hariz Islas Flores**



Toluca Estado de México, 2022

## **Tabla de contenido**

<b><i>Resumen</i></b> .....	<b>4</b>
<b><i>Antecedentes</i></b> .....	<b>5</b>
<b>Contaminantes emergentes</b> .....	<b>5</b>
<b>Fármacos</b> .....	<b>6</b>
<b>Antibióticos</b> .....	<b>7</b>
<b>Vías de entrada de compuestos antibióticos en ambientes acuáticos</b> .....	<b>8</b>
<b>Tetraciclina</b> .....	<b>9</b>
<b>Concentraciones de tetraciclina en el ambiente</b> .....	<b>12</b>
<b><i>Planteamiento del problema</i></b> .....	<b>32</b>
<b><i>Pregunta de investigación</i></b> .....	<b>34</b>
<b><i>Hipótesis</i></b> .....	<b>34</b>
<b><i>Objetivos</i></b> .....	<b>34</b>
<b><i>Metodología</i></b> .....	<b>35</b>
<b><i>Resultados</i></b> .....	<b>40</b>
<b><i>Discusión</i></b> .....	<b>67</b>
<b><i>Conclusiones</i></b> .....	<b>73</b>
<b><i>Bibliografía</i></b> .....	<b>74</b>
<b>Anexo 1: Evidencia de envío del artículo de investigación</b> .....	<b>87</b>

## Resumen

La presencia de productos farmacéuticos, como la tetraciclina, en los cuerpos de agua se ha convertido en un problema potencial, debido a que diversos estudios han reportado a estos compuestos como causantes de efectos negativos en organismos acuáticos. El objetivo de este estudio es evaluar la influencia del cambio de alimentación en los progenitores de un alimento comercial a un alimento funcional enriquecido con antioxidantes, vitaminas y minerales sobre los efectos embriotóxicos y teratogénicos inducidos por la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de tetraciclina en embriones de *Danio rerio*. Un grupo de peces progenitores fue alimentado con alimento comercial y otro con alimento enriquecido, posteriormente sus embriones se expusieron a diferentes concentraciones del fármaco y se evaluó el efecto tóxico mediante el cálculo de la  $CL_{50}$ , la  $CE_{50\text{malformaciones}}$ , el índice teratogénico y la identificación de malformaciones. Los resultados expusieron que no hubo diferencia significativa en el porcentaje de mortalidad entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ); mientras que en el porcentaje de malformaciones si hubo diferencias significativas, disminuyó el porcentaje de organismos malformados en el grupo del alimento funcional. En cuanto a la evaluación del desarrollo de acuerdo a la escala de Hermsen, las diferencias se evaluaron entre las concentraciones a las que fueron expuestos, en el grupo del alimento comercial las diferencias significativas comenzaron en la concentración de 150 ng/L hasta la de 450 ng/L; en el grupo de alimento funcional comenzaron en la concentración de 300 ng/L hasta la de 500 ng/L. Las  $CL_{50}$  calculadas resultaron ser 3,378.966 ng/L y 5,888.049 ng/L, para el alimento comercial y enriquecido, respectivamente; las  $CE_{50\text{malformaciones}}$  del alimento comercial fue de 799.227 ng/L y la del alimento enriquecido fue de 1,536.087 ng/L; resultando en los correspondientes valores del índice teratogénico de 3.833 y 4.228. Se encontró la prevalencia de 11 principales malformaciones, las cuales fueron edema pericárdico, ausencia de aleta pectoral, ausencia de cabeza, hemorragia, oscurecimiento del saco vitelino, ausencia de cola, malformación de cola, no eclosión, malformación de ojo, malformaciones craneofaciales y malformación de la corda, todas se presentaron con mayor frecuencia en el grupo de alimento comercial.

## **Antecedentes**

### Contaminantes emergentes

En las últimas décadas, se ha detectado la presencia de una serie compuestos contaminantes, cuya presencia en el ambiente no es nueva, sin embargo, recientemente se han comenzado a considerar como xenóbioticos, estos son llamados contaminantes emergentes (Elizalde, 2017). Las concentraciones de estos compuestos han ido en aumento como consecuencia de las actividades antropogénicas y han comenzado a recibir atención para la realización de estudios sobre su presencia en el ambiente (Carvalho, 2016), así como sobre sus posibles efectos ecológicos. Los contaminantes emergentes no se encuentran regulados por una legislación, pero son candidatos para ello, dicha regulación depende de los resultados arrojados por las investigaciones, es decir, los datos de la incidencia de estos, así como su capacidad para producir efectos negativos en la salud de los organismos (Tejada, 2014).

Los contaminantes emergentes comprenden variedad de sustancias, que se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, también persisten en él debido a que son de uso constante (Carvalho, 2016). Entre ellos se tienen compuestos como fármacos, productos de higiene personal, edulcorantes artificiales, retardantes de llama, pesticidas, metales pesados, surfactantes, aditivos industriales, esteroides, hormonas, así como productos de desinfección (Tran, 2018; Carvalho, 2016; Díaz, 2013).

Estos contaminantes llegan a los cuerpos de agua a través de diferentes fuentes: la descarga de aguas residuales domésticas, efluentes industriales y hospitalarios, de efluentes de las mismas plantas de tratamiento de aguas residuales, fugas y desbordamiento del alcantarillado, aguas residuales de uso agrícola (SanJuan-Reyes, 2017). Su liberación continua al medio ambiente, a través de descargas directas en los cuerpos de agua o por los residuos no eliminados en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), ha permitido que estos compuestos se

vuelvan pseudopersistentes en el ambiente, este término hace referencia a que la tasa de introducción al medio supera la vida media de los contaminantes emergentes en el ecosistema (Brooks B. M., 2008).

Debido a que este tipo de contaminantes están siendo recientemente investigados no hay mucha información acerca de sus efectos sobre el ambiente y sobre los organismos (Brooks, 2008). Por ello se requiere una investigación exhaustiva para describir y evaluar las consecuencias de la presencia de contaminantes emergentes, los cuales se encuentran en un rango de concentración  $<100$  mg / kg en suelo y  $<1$  mg / L en agua, además en este rango de concentraciones se han reportado efectos adversos en los organismos (Brooks, 2008). Estudios de este tipo son los que darán pauta para proponer e implementar nuevas leyes y estrategias para reducir, regular o remover compuestos que podrían representar un riesgo.

#### Fármacos

Los productos farmacéuticos, una vez que llegan al medio ambiente, pueden ser transportados y distribuidos en el agua, aire, suelo o sedimentos dependiendo de factores tales como las propiedades fisicoquímicas del producto y las características del medio receptor. Los fármacos, además de convertirse en un problema ambiental, representan también un riesgo para los seres vivos, ya que están diseñados para tener una ruta y una acción específica tanto en los seres humanos como en los animales. Una vez que estos productos llegan al medio ambiente pueden afectar a los animales con órganos, tejidos, células o biomoléculas similares a los de la especie objetivo. Por otro lado, los medicamentos se diseñan para que sean persistentes, lo que significa que pueden mantener su estructura química un tiempo suficientemente grande como para ejercer su trabajo terapéutico, por lo tanto, una vez que entran en los cuerpos de agua persisten en ellos (León, 2015).

Ante la presencia de fármacos en el ecosistema los organismos tienen como respuesta efectos adversos, entre los cuales se han reportado: falla renal, resistencia a antibióticos, desordenes endócrinos, fallos en la reproducción,

cambios en el crecimiento y desarrollo, estrés oxidativo e incluso la muerte (Quintero, 2017).

## Antibióticos

Entre los fármacos se encuentra un grupo en particular, el de los antibióticos, los cuales suscitan preocupación ecológica debido a que los principales ciclos de nutrientes en el medio ambiente dependen de la actividad de las comunidades bacterianas (Oldenkamp, 2019) y porque son capaces de inducir resistencia bacteriana a los antibióticos (León, 2015).

Desde su descubrimiento, los antibióticos han resuelto la necesidad de tratar las infecciones bacterianas, tanto en humanos como en animales. Además, han sido empleados como aditivos para estimular el crecimiento y prevenir infecciones en la cría de animales, estos casos en dosis subclínicas (Hou, 2015; Zhu, 2013).

Actualmente, los antibióticos son ampliamente usados en todo el mundo para curar enfermedades infecciosas en humanos y animales. Estos compuestos están diseñados para inhibir o matar a los microorganismos que producen dichas enfermedades (Santos, 2016). El consumo total de antibióticos en 2013 alcanzó las 320.000 t en todo el mundo, sin embargo, la mitad se utilizó en China (162.000 t), incluidos los de uso veterinario (Zhang, 2015).

Aunque desde 1998 está prohibido el uso de antibióticos como aditivos alimentarios en Europa, en China y USA todavía se usan. Además, según el Departamento de Agricultura de USA, los TC (antibióticos del grupo de las tetraciclinas) representan el 15.8% de todos los antibióticos utilizados para la alimentación de los cerdos (Xu, 2019). Una de las áreas más importantes de consumo de antibióticos es la ganadería, ya que tan solo en 2015 se utilizaron 63,000 toneladas en todo el mundo (Alhaji, 2018). El uso de antibióticos sigue en aumento, a pesar del incremento de medidas de restricción sobre su uso, y se estima que para el 2030 su uso para uso veterinario aumentará en un 67%, con respecto al 2010 (Van Boeckel, 2015).

Al ser ampliamente consumidos estos compuestos llegan en cantidades considerables a los cuerpos de agua y a las plantas de tratamiento de aguas residuales, donde pueden afectar a las comunidades bacterianas utilizadas para la degradación biológica y, en consecuencia, disminuir la eficiencia de eliminación de otros contaminantes del agua (Oldenkamp, 2019).

Aunque se ha detectado la presencia de antibióticos en cuerpos de agua de todo el mundo, sus efectos ecológicos y de desarrollo han sido poco investigados, particularmente en organismos no objetivo. Los organismos vertebrados muestran potencial para evaluar la toxicidad crónica y los efectos potenciales de los antibióticos, en particular en los procesos bioquímicos y los objetivos moleculares (Liu L. W., 2018).

Algunos de estos fármacos están siendo considerados por la EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) como posibles candidatos a ser incluidos en la lista de los contaminantes orgánicos prioritarios en el agua potable (Tejada, 2014).

#### Vías de entrada de compuestos antibióticos en ambientes acuáticos

La principal vía de entrada de los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP's) a las aguas superficiales es la descarga de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) municipales, debido a que el proceso de tratamiento es inespecífico para eliminar productos farmacéuticos o de cuidado personal, también pueden ingresar en forma de biosólidos, lixiviados de rellenos sanitarios, vertidos de prácticas acuícolas o áreas agrícolas (Brooks, 2008). También llegan a los cuerpos de agua una vez que se excretan, después de haber completado su función en el organismo objetivo, por lo general, en su forma activa tanto en la orina como en las heces (Brooks, 2008). Además, otra fuente de contaminación por antibióticos son los efluentes de aguas residuales de las empresas farmacéuticas (Javid, 2016).

Otra de vía importante de contaminación por antibióticos y otros medicamentos veterinarios es, evidentemente, el agua que se ha utilizado para la cría intensiva de ganado y para la acuicultura (Brooks, 2008). Estos compuestos ingresan al ambiente por diferentes vías como escorrentías, fugas de lagunas, lixiviación de estiércol aplicado a los campos y lixiviación de granjas de animales. Por ejemplo, un estudio en China, reportó que granjas porcinas y lecheras calcularon que un cerdo y una vaca excretan 18.2 y 4.24 mg, respectivamente, lo que resulta en 3080 y 164 toneladas por año (Longyao Xu, 2021). Por otro lado, la acuicultura, como las granjas camaroneras, también son fuentes de este tipo de compuestos, especialmente de tetraciclinas, que luego se mezclan con el agua de mar y los afluentes de los ríos (Zhang, 2018)

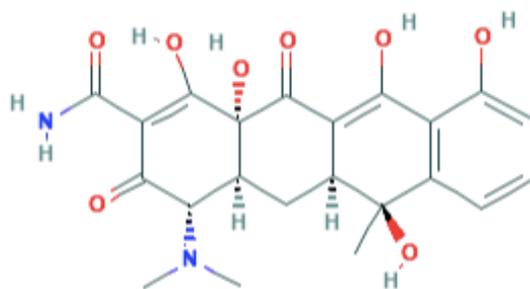
Los medicamentos son contaminantes particularmente diferentes, debido a que se descargan no solo como el compuesto original, sino que también se excretan como combinaciones de metabolitos, todos estos compuestos luego se combinan con otros contaminantes ya presentes en el ambiente. La mezcla de todo lo anterior, su porcentaje y concentración específicos dificulta el estudio en condiciones de laboratorio, ya que es necesario simular cada vez más posibilidades de combinaciones para comprender los posibles efectos adversos (Brooks, 2008).

#### Tetraciclina

Según su estructura química, los antibióticos se pueden clasificar en: betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos y sulfonamidas (Chang, 2015; Dagherir, 2013).

El grupo de las tetraciclinas es de los más usados a nivel mundial, se ha reportado en estudios, como el de Xie y col. (2010), que las tetraciclinas ocupan el segundo lugar mundial en producción y uso. Este medicamento se usa principalmente para infecciones de la piel, del tracto genitourinario, gastrointestinales, respiratorias, entre otras (Lesnik, 2015).

Específicamente, el fármaco de interés de este estudio es la tetraciclina, el cual es un antibiótico de acción corta que inhibe el crecimiento bacteriano al inhibir la traducción. Su mecanismo de acción consiste en unirse a la subunidad ribosomal 30S, evitando que el tRNA de amino-acilo se una al sitio A del ribosoma, esto en las células bacterianas, esta unión es reversible. Además, la tetraciclina puede alterar la membrana citoplasmática de las bacterias y provocar la fuga de los contenidos intracelulares (National Center for Biotechnology Information, 2020).



**Figura 1. Estructura química de la tetraciclina (National Center for Biotechnology Information, 2020).**

En 2010 las tetraciclinas (TC's) ya eran las segundas en producción y uso a nivel mundial y las primeras en China (Xie X. Z., 2010), esto posiblemente porque son algunos de los antibióticos más baratos (Daghrir, 2013). Por ejemplo, en Japón las TC's para uso veterinario representan el 43% del consumo total utilizado en ese país además, en Alemania, la cantidad de tres grupos principales de antibióticos como TC's, sulfonamidas y penicilinas para uso veterinario alcanza las 542 toneladas por año, representando solo estos tres grupos el 73% de todos los antibióticos (Longyao Xu, 2021). Además, en Europa se utilizan >2500 toneladas de TC's al año para tratamiento veterinario, siendo las tres más comunes son tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina (Lundstrom, 2016).

Algunas características de las TC's que afectan su comportamiento en el medio ambiente son su alta solubilidad acuosa que ronda de 231 a 603 mg/L, dependiendo del compuesto específico, su bajo coeficiente de partición octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ) que está en el rango de  $-0,02$  a  $-1,25$ , eso indica que las TC's son hidrófilas, tienen valores de pKa relativamente bajos, por lo que los compuestos de este grupo son

relativamente estables en ácidos, pero no en medios alcalinos (Azanu, 2018; Jafari Ozumchelouei, 2020). Según Lin, 2013, este grupo de compuestos tiene una vida media prolongada en el medio acuático de que va de 34 a 329 h. Dichas propiedades fisicoquímicas tienen un papel importante en el comportamiento de las TC's en ambiente, las cuales se resumen en la **Tabla 1**.

Por otro lado, sus productos de transformación también son importantes en el medio ambiente ya que, según Sengupta, 2016, los productos de transformación de TC comienzan a crearse en los primeros cinco días, a medida que el fármaco original comienza a disminuir los isómeros ETC (epitetraciclina) y el ATC (anhidrotetraciclina) aumentan en concentración, se estima que la TC desaparece totalmente a los 20 días.

Algunas consecuencias de la presencia de TC a largo plazo en el ambiente son la bioacumulación en los organismos acuáticos a través de la cadena alimentaria y los riesgos ecológicos. Los factores de bioacumulación (BAF), que se definen como la relación entre la concentración de contaminantes en el tejido del organismo acuático y la del agua; estos BAF al mismo tiempo se ven afectados por otros factores como Kow, solubilidad en lípidos y muestreo de tejido. Así mismo, las TC cuyos BAF sean superiores a 5000 L/kg se consideran bioacumulables, mientras que si están en el rango de 2000–5000 L/kg son potencialmente bioacumulables (Gao, 2012). Algunos ejemplos de BAF's son: TC con 1677 L/kg y OTC con 509 L/kg, estos valores, menores a 2000 L/kg, fueron medidos en peces y cangrejos, por otro lado, la DXC tiene un valor de BAF de 4,456 L/kg hace es potencialmente bioacumulable en músculos de invertebrados y peces (Li W. S., 2012).

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de TC (Lin, 2013).

<b>Compuesto</b>	<b>Peso molecular (g/mol)</b>	<b>Punto de fusión (°C)</b>	<b>Solubilidad en agua (mg/L) (25°C)</b>	<b>pKa</b>	<b>K<sub>ow</sub></b>
Tetraciclina	444.44	172.5	231	3.3, 7.68, 9.69	-1.25

Otro punto a considerar es la asociación entre las TC's y la materia orgánica, la cual resultó más fuerte de lo esperado en el estudio de Wang, 2019, esto se puede explicar a través de las interacciones entre esos dos, como el puente de cationes, el enlace de hidrógeno y la complejación de la superficie que contribuyen significativamente a la alta sorción de TC en la materia orgánica (MO). Además, debido a que las TC tienen un valor de coeficiente de partición MO/agua en un rango de 1,430-2,060 L/kg, que es elevado, las TC's que están asociadas a materia orgánica disuelta o particulada aumentan su movilidad en fuentes de agua donde hay materia orgánica (Wang, 2019).

Las TC's y otros antibióticos perduran en el medio ambiente, especialmente en el agua, debido a que las PTAR convencionales no incluyen procedimientos especializados que los eliminen, esto, en parte, se debe a la alta concentración de materia orgánica disuelta en las aguas residuales, lo cual contribuye a la disminución de la eficiencia de remoción en el proceso de coagulación. Además de que estos compuestos no se consideran como prioritarios a eliminar, incluso con la resistencia a antibióticos aumentando (Choi, 2008).

#### Concentraciones de tetraciclina en el ambiente

En cuanto a su presencia en el ambiente, en China, (Chen Y. C.-H., 2018) reportaron concentraciones en ríos de 9.1 a 300.7 ng/L y en sedimentos de 6.0 a 95.7 mg/Kg. Tran (2018), realizaron una revisión de las concentraciones promedio en plantas de tratamiento de aguas residuales, encontrando en Asia

concentraciones de 12,340 y 1,536 ng/L, en Norteamérica de 48,000 y 3,600 ng/L y en Europa de 850 y 790 ng/L, en influentes y efluentes de las plantas de tratamiento, respectivamente. Guerra, 2014 encontraron concentraciones promedio de 53 ng/L en influentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en Canadá. En el estudio de Shimizu en 2013, informaron concentraciones por debajo de 1000 ng/L en cinco países del continente asiático como Vietnam, Filipinas, India, Indonesia y Malasia. En la **Tabla 2** resumen de las concentraciones de TC's en el ambiente.

Las TC's que se administran a los animales generalmente se excretan a través de la orina y las heces en su forma activa, alrededor del 70-90%, estos antibióticos ingresan al ambiente a través de las aguas residuales y los sedimentos del suelo de granjas o sitios de acuicultura (Jjemba, 2006; Halling-Sorensen, 2000). Además, Xu, 2021 sugiere que una posible fuente de residuos de TC en agua podría ser la alimentación de los peces.

A pesar de que las TC's tienen mayor afinidad con el suelo, si éste se encuentra saturado de estos compuestos farmacéuticos, se infiltran al agua limpia en los recursos subterráneos, lo que contribuye a la contaminación de las fuentes de agua; esto se conoce como terracumulación (Miao, 2004; Rooklidge, 2004; Tolls, 2001). Además, dado que las TC permanecen en su forma activa, incluso cuando están unidos al suelo, su presencia en las fuentes de agua sigue siendo un problema. (Javid, 2016).

Las concentración de TC reportada en América por Batt, 2006, específicamente en Estados Unidos, fue en efluentes municipales en una PTAR con los siguientes valores 170-850 ng /L. Mientras, en Canadá, Miao, 2004 reportaron un rango de concentraciones de 150 a 970 ng/L.

Por otra parte, en el continente asiático fueron los siguientes, en China alrededor del 10-90% de los antibióticos se vierten en los ríos sin tratamiento previo (Tang, 2019; Xie, 2019). En el norte de China, en muestras de agua subterránea cerca de granjas porcinas se detectaron a  $19.9 \times 10^3$  ng/L de TC y en muestras una aldea cercana se detectó a  $29.7 \times 10^3$  ng/L (Li, 2018). En el estudio de Wang, 2017 se

encontró TC en los ríos cercanos al lago Honghu, en China, a 2,670 ng/L en noviembre, mientras que en mayo fue de 1,070 ng/L. Además, tres ríos en Beijing mostraron presencia de TC, el río Wenyu reportó una concentración de 9500 ng/L, el río Qinghe de 8860 ng/L y el río Tonghui de 6800 ng/L (Xu Y. G., 2016). En muestras de ríos en Hong Kong la concentración de TC reportada fue de 31.5 ng/L (Deng, 2018). Por otro lado, se reportó clortetraciclina (CTC) en ríos de Corea del Sur en concentraciones de 2,093, 1,236 y 793 ng/L (Kim, 2016). En Singapur, un efluente de una PTAR reportó un rango de concentración de TC de 1.24 a 12.34 µg /L (Tran, 2016). Además, en Irán, la TC fue el segundo antibiótico con mayor concentración en los efluentes de una PTAR municipal con 0.011 µg /L y en la PTAR hospitalaria fue en un rango de 0.068 a 0.144 µg /L (Kafaei, 2018). En otro influente de PTAR en Teherán, Irán, se detectó TC en el rango de 0.28 a 0.54 µg /L (Javid, 2016). En las aguas superficiales, en Yaft-Abad, Irán, la TC presentó concentraciones entre 5.4 y 8.1 ng /L (Javid, 2016).

En cuanto a la frecuencia, en el estudio de Wang, 2019, la TC y la OTC (oxitetraciclina) resultaron ser los antibióticos más comunes en las fuentes de agua potable, esto en el bajo del río Yangtze, la mayor frecuencia se detectó durante la estación seca (enero) con un 27.2%; en segundo lugar, se detectaron DXC y EOTC con un 14.3%; mientras que en época de inundaciones, DXC y α-OTC obtuvieron la mayor detección con 21.4% y 14.3%, respectivamente (Wang, 2019).

En Europa, en el río Soeste, en Alemania, se reportó TC a una concentración de 21 ng /L (Burke, 2016). Y en Países Bajos, se detectó OTC a 100 ng /L en aguas subterráneas (Kivits, 2018).

**Tabla 2.** Concentraciones ambientales de TC's.

Compuesto	País	Concentración	Sitio	Referencia
TC	Uganda	2.7 - 70 ng/L	Muestras de agua del Lago Victoria	(Bashahun, 2015)

OTC	España	60 µg/kg	Muestras de peces comercialmente disponibles	(Pereira, 2015)
TC	Alemania	21 ng/L	Río Soeste	(Burke, 2016)
TC OTC CTC	China	12,000 – 3,170 ng/L 334,000 - 32,000 ng/L 18,000 - 391 ng/L	PTAR de industrias farmacéuticas (influyente y efluente, respectivamente)	(Hou J. W., 2016)
TC OTC	Hong Kong	30 – 497 ng/L 7 - 104 ng/L	Tres ríos de Hong Kong	(Selvam, 2016)
TC ETC EATC ATC	Cuencas de los ríos Eufrates y Tigris	8.2 – 50.0 µg/L 9.4 – 88.1 µg/L 8.2 -35.8 µg/L 6.54 – 28.3 µg/L	Presa abajo de Keban y lago arriba de Karakaya	(Topal, 2016)
TC	Singapur	1.24 - 12.34 ng/L	Influyente de PTAR	(Tran N. C., 2016)
TC	China	6,800 – 9,500 ng/L	Tres ríos urbanos en Beijing	(Xu Y. G., 2016)
TC	China	31 - 160 ng/g (peso seco)	Sedimentos del mar Bohai	(Xu Y. G., 2016)

			y del mar Yellow	
TC,s	Irán	18.6 ng/L abril, 28.5 ng/L septiembre	Agua superficial de la costa norte del Golfo Pérsico	(Zhao, 2016)
TC	Irán	0.1 - 1.0 ×10 <sup>5</sup> ng/g peso seco	Sedimentos de río	(Zhao, 2016)
Tetraciclina Doxiciclina Oxitetraciclina Clortetraciclina	China	10.14 ng/L 129.14 ng/L 15.28 ng/L 4.29 ng/L	Río Meijiang	(Chen F. Y., 2017)
TC OTC CTC DXC	China	10.8 ng/L 48.7 ng/L 18.1 ng/L 39.7 ng/L	Lago Doyang Lago Chaohu Lago Dianchi Lago Baiyangdian Lago Dongting Lago Poyang	(Ding, 2017)
TC	Hong Kong	0.6 ng/L	Agua superficial	(Li N. H., 2017)
TC OTC CTC	China	745-1,450 ng/L 683-2,800 ng/L 426-1,403 ng/L	Cuatro lagos en Honghu	(Wang Z. D., 2017)

TC,s (TC, OTC y CTC)	Jiangnan Plain, China	7.24 – 9.51 ng/L primavera 1.10 – 4.84 ng/L verano 1.2–6.0 ng/L invierno	Muestras de agua subterránea	(Yao, 2017)
TC, OTC, CTC	Norte y sureste de China	184, 237 y 8 ng/L, respectivamente	Agua subterránea poco profunda	(Chen L. L., 2018)
TC	China	16.8 ng/g peso seco	Sedimentos de Hong Kong	(Deng, 2018)
TC	Irán	10.1 ng/g peso seco en invierno 11.7 ng/g peso seco en verano	Sedimentos costa norte del Golfo Pérsico	(Kafaei, 2018)
TC's	Agua marina de China	35.1 – 42.4 ng/L	Costa del área de Zhuhai	(Li S. S., 2018)
OTC CTC	China	1.56 – 87.89 ng/L 1.07 – 26.78 ng/L	Río Weihe	(Li Y. F., 2018)
TC	China	1.55 ng/L	Mar Yellow	(Li S. S., 2018)

TC's	China	35.1 – 42.4 ng/L	Muestras de agua del área costera de Zhuhai	(Li Y. F., 2018)
TC OTC	China	98.3 ng/L 270 ng/L	Muestras de agua del Mar Bohai	(Li S. S., 2018)
OTC TC	China	La más alta 15,100 ng/L, el promedio 275 ng/L  Más alta 2,310, 42.1 ng/L promedio	Mar del sur de China	(Liu H. Y., 2018)
TC CTC	China	21.5 ng/L 6.5 ng/L	Lago Dongting	(Liu H. Y., 2018)
TC	China	12.1 – 1,140 ng/kg peso seco en verano  11.7–347 ng/kg peso seco en invierno	Sedimentos del pantano Three Gorges	(Lu L. L., 2018)
TC's	Lago Taihu	44.0 – 68.6 ng/L	Aguas de uso de acuicultura	(Nkoom, 2018)
TC OTC	China	0.15 ng/L 0.42 ng/L	Efluente de una PTAR en Guangdong	(Zhang R. P., 2018)

CTC		0.93 ng/L		
DXC		0.11 ng/L		
TC OTC CTC DXC	China	102 µg/kg peso seco (ps) 65 µg/kg ps 128 µg/kg ps 94 µg/kg ps	Lodo de la provincial Guangdong	(Zhang R. P., 2018)
TC's	Sur de China	Influente 0.18 – 9.01 µg/L Efluente 0.11 – 0.93 µg/L Lodo 65–128 µg/kg ps	Golfo Beibu	(Zhang R. P., 2018)
TC	China	68.6 - 632 ng/L	Cuenca del río Huaihe	(Bai, 2019)
TC	Irazg, Turkey	Influente inicial 10.3 µg/L Influente del clarificador primario 5.92 µg/L Influente del segundo clarificador 7.12 µg/L	PTAR (proceso de lodos activados)	(Bisognin, 2019)

		Efluente 6.24 µg/L  Lodo 43.2 µg/kg ps		
OTC  TC	China	15,100 ng/L  2,310 ng/L	Mar del sur de China	(Li X. W., 2019)
OTC  OTC  TC	Mar Yellow	7.29 ng/L estación de lluvias  13.12 ng/L estación seca  0.42 ng/L estación seca	Estanques de maricultura	(Lu, 2019; Han, 2020)
TC's	Norte de China	36.7 ng/L	Bahía Jiaozhou	(Peng, 2019)
TC's	Norte de China	59.8 ng/g peso seco estación seca  71,480 ng/g peso seco estación de lluvias	Sedimentos del mar Yellow	(Sun, 2019)
TC	Hanoi, Vietnam	6 ng/L	Canales urbanos y lagos en Hanoi	(Tran N. H., 2019)
TC	China	11.16 ng/L	Río abajo Yangtze	(Wang Z. C., 2019)

OTC		18.98 ng/ L		
DXC		56.09 ng/L		
EOTC		19.36 ng/L		
CTC		5.86 ng/L		
ICTC		8.38 ng/L		
TC's	China	0.26 – 81.50 ng/L	Área costera de Guangdong	(Xu D. X., 2019)
TC	China	12.8 ng/g ps	Sedimento del lago Changshou	(Lu L. L., 2020)

### Estudios previos

Con respecto a efectos tóxicos inducidos por la presencia de tetraciclina en ambientes acuáticos se mencionan algunos estudios.

En Isidori, 2005, realizaron ensayos de toxicidad aguda con seis antibióticos en organismos acuáticos, uno de ellos perteneciente al grupo de las tetraciclinas, la oxitetraciclina, los resultados de las pruebas de toxicidad aguda fueron los siguientes: la  $CE_{50}$  que se obtuvieron para cada especie fueron 64.5 mg/L para *V. fischeri*, 34.21 mg/L para *B. calyciflorus*, 25 mg/L para *T. platyurus*, 22.64 mg/L para *D. magna* y 18.65 mg/L para *C. dubia*. Mientras que los resultados de las pruebas de toxicidad crónica arrojaron los siguientes valores de  $CE_{50}$ : 0.17 mg / L para *P. subcapitata*, 1.87 mg / L para *B. calyciflorus* y de 0.18 mg / L para *C. dubia*.

En 2013, Yang *et al.*, encontraron una significativa inhibición de la tasa de crecimiento de *Microcystis aeruginosa* a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.5 y 1.0 mg/L, el fármaco mostró un comportamiento hormético a la concentración de 0.05 mg/L.

En un estudio generacional de Kim, en 2012 evaluaron los efectos de la exposición a TC sobre la supervivencia, reproducción y crecimiento en *D. magna*, durante 21 días por cada una de las generaciones. Los resultados arrojaron que tanto el crecimiento somático como la reproducción decrecieron en las cuatro generaciones observadas. El principal efecto negativo en la reproducción fue la disminución del número total de neonatos, el cual disminuyó de manera concentración dependiente, en la en la generación parental fue de 180 aproximadamente. Así mismo, los valores de NOEC (concentración sin efecto observado) se redujeron, comenzando en 10 mg/L para la generación parental o filial (F0) alcanzando solo 0.1 mg/L en la tercera generación (F3); también los valores LOEC (concentración mínima a la que se observa un efecto) fueron disminuyendo en cada generación, comenzando en 10mg/L en F0, 2 mg/L en F1, 0.1mg/L en F2 y 0.1 mg /L en F3, esta disminución en las concentraciones NOEC y LOEC indican un aumento en la sensibilidad por la exposición crónica a TC crónica en *D. magna*. Además, la edad de la primera reproducción se atrasó un 43% en la primera generación en los organismos expuestos a 10mg/L, con respecto al grupo control finalmente los retrasos se retrasaron en promedio del 12.4-12.5% en todas las concentraciones de exposición en las generaciones F1 y F2, por su parte en la generación F3 observaron un retardo del 80% en todas las concentraciones de TC (Kim H. L., 2012).

Un estudio previo a este, igualmente en embriones de *Danio rerio*, es el de Zhang en 2015, donde de los embriones se expusieron a tres concentraciones de TC (2, 20 y 200 µg/L). Los resultados que obtuvieron fueron disminución de la longitud corporal, retrasos de eclosión, aumento de tamaño del saco vitelino y ausencia de vejiga natatoria estos efectos aumentaron de manera concentración-dependiente. La CE<sub>10</sub> a las 96 h de exposición resultó ser de 3.16 µg/L, concentración que es cercana a las reportadas en el ambiente; es decir que la presencia de TC a las concentraciones ya presentes en el medio pueden ocasionar efectos negativos en los organismos.

En otro estudio de Escobar *et al.* en 2020, evaluaron tanto la embriotoxicidad como la tertogenicidad inducida por TC en otra especie de pez, *Cyprinus carpio*, donde

reportaron una  $CL_{50}$  de 500.08 mg/L y una  $CE_{50}$  de malformaciones de 145.3 mg/L, con lo cual el índice teratogénico resultó de 3.44, demostrando que la tetraciclina es teratogénica a esas concentraciones para los embriones de *Cyprinus carpio*. Las principales malformaciones que identificaron fueron malformaciones en la cola, estructura de cuerda modificada, edema pericárdico, escoliosis y malformaciones del corazón.

Particularmente, los antibióticos se detectan en el rango de ng/L tanto en PTAR como en aguas superficiales. Una vez que los medicamentos están en el ambiente, pueden ser degradados por la luz en el proceso llamado fotodegradación, la cual es la principal vía de degradación de los fármacos, sin embargo, aun no existen suficientes estudios de toxicología para determinar si los productos de fotodegradación son más o menos peligrosos para los organismos. Por otro lado tenemos a resistencia a los antibióticos, la cual repercute directamente a nivel de ecosistema, ya que son los microorganismos los responsables de la mayoría de los ciclos y procesos en el suelo y el agua. En el medio acuático la ruta más probable para los antibióticos es a través de los efluentes de aguas residuales, por lo que es razonable que sus efectos sean mayores en sistemas acuáticos que reciben estos insumos (Brooks, 2008)

Los antibióticos en el medio acuático también son un problema porque pueden acumularse en los organismos e integrarse a la cadena trófica, por lo que, estos compuestos podrían incluso afectar la salud humana (Liu X. Z., 2019; Wilson, 2004). No obstante, se sabe que los antibióticos son más tóxicos para los microorganismos o las plantas que para los invertebrados y los vertebrados (Brooks, 2008).

En cuanto a la sensibilidad de los organismos a la presencia de antibióticos, los más sensibles son los productores primarios acuáticos, es decir, las cianobacterias (Brooks, 2008). Por ejemplo, la presencia de TC's de los lodos de una PTAR, reportó inhibición del crecimiento en microorganismos, las  $CE_{50}$  resultaron 80, 30 y 80  $\mu\text{g/L}$  para tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina, respectivamente (Brooks, 2008). Además, se ha reportado inhibición del crecimiento y alteración en la

reacción fisiológica, en el sistema fotoquímico primario y sistema antioxidante, en *Microcystis aeruginosa* y en *Selenastrum carpicornutum* debido a la exposición a TC (Yang W. T., 2013).

En Xu, 2019, reportaron las  $CE_{50}$  para el alga verde *Chlorella vulgaris*, a las 96 h de exposición a TC y sus dos principales productos de degradación anhidrotetraciclina (ATC) y epitetraciclina (ETC), los valores respectivos fueron 7.73 mg / L, 5.96 mg / L y 8.42 mg / L. Además, se reportó que la exposición a bajas concentraciones de estos tres, <2.5 mg / L, puede causar permeabilidad de las células, pero cuando la concentración aumenta a 5 mg/L la permeabilidad ya es significativamente mayor que en el grupo de control. En el mismo estudio también se observaron deformaciones y reducción de tamaño en las laminillas tilacoides (en cloroplastos), aumento del tamaño de las vacuolas y el tamaño de las mitocondrias también aumentó. Además, el citoplasma y el citodermo estaban separados debido a la contracción del citoplasma y la citomembrana. Concluyeron que estos daños en los tilacoides podrían afectar el sistema enzimático de la fotosíntesis. Sobre el estrés oxidativo, en el grupo expuesto a 5 mg/L de ATC la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo de control; por otro lado, los expuestos a TC comenzaron a mostrar un aumento significativo a 10 mg/L ( $p < 0.05$ ), mientras que la exposición a ETC tuvo solo un efecto pequeño en la producción de ROS. La actividad de SOD de las células de algas aumentó en respuesta a concentraciones crecientes de TC, ATC y ETC. Además, los grupos tratados con 5 mg/L de TC y ATC y 10 mg /L de ATC mostraron una actividad de SOD significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) que el control. Sin embargo, el aumento en la actividad de SOD no fue significativo en todo el rango de concentración de prueba de ETC. La actividad de catalasa (CAT) de las células de algas expuestas a ATC fue significativamente mayor que la del grupo de control, excepto para el tratamiento de 2.5 mg/L. La actividad antioxidante de CAT fue significativamente mayor en los grupos tratados con 5 mg/L y 10 mg/L de TC y la presencia de malondialdehído (MDA) fue mayor en 5 mg/L de TC y ATC ( $p < 0.01$ ), con 10 mg/L de ATC y ETC los niveles de MDA fueron mayores ( $p < 0.01$ ). Otro aspecto evaluado en este estudio fue la permeabilidad de las células, que resultó

aumentada con la concentración de 10 mg/L. Los autores concluyeron que todos los aspectos anteriores finalmente provocaron una disminución en la tasa de crecimiento celular (Xu D. X., 2019).

El estudio de 2017, Ye et al. evaluaron la inhibición del crecimiento de tres antibióticos del grupo de las tetraciclinas en *M. aeruginosa*, en orden de mayor a menor toxicidad resultaron tetraciclina > clortetraciclina > oxitetraciclina, ya que los valores de CE<sub>10</sub> fueron 0.63, 1.86 y 3.02 mg/L, respectivamente, y los valores de la CE<sub>20</sub> fueron 1.58, 4.09 y 4.86 mg/L en el mismo orden (Ye, 2017).

Además, los productos de degradación de la TC también han mostrado efectos tóxicos. Por ejemplo, el anhídrido ftálico, con una CE<sub>50</sub> de 106 mg/L a 96 hpf (horas post fertilización) en pez, la cual es menor que la de la TC que fue de 760 mg/L, indicando que el producto de degradación es más tóxico para los peces que la misma TC (Liu H. Y., 2018). Igualmente en el estudio de Han, en 2020, se concluyó que la conversión de OTC aumentó la toxicidad en el proceso de oxidación, así como la tasa de inhibición de luminiscencia de *Vibrio fischeri*. Otro ejemplo es el estudio de Wei en 2019, donde los productos de fototransformación de CTC y TC inhibieron la tasa de luminiscencia de *Vibrio fischeri*, los valores de CE<sub>50</sub> de los productos fotodegradados CTC y TC (15 min sin irradiación UV) fueron 4.7 y 24.9 mg/L, respectivamente, y después de 15 min de irradiación UV, los valores de CE<sub>50</sub> fueron 22.6 y 24.5 mg/L, respectivamente.

Por otro lado, en organismos complejos como *Daphnia magna*, la NOEC a las 48 h de exposición a tetraciclina fue de 340 mg/L y la CE<sub>50</sub> para la reproducción fue de 44.8 mg/L (Brooks B. M., 2008).

Además, dos estudios previos, Kang, 2005 y Kim, 2007, mostraron que dos fármacos de este grupo, la oxitetraciclina y la clortetraciclina, indujeron la producción de vitelogenina en machos del pez *Oryzias Latipes* a una concentración de 10 mg/L, por lo tanto, lo cual puede causar problemas endócrinos, por otro lado, a 0.1 mg/L de clortetraciclina se redujo la vitelogenina en las hembras.

Adicionalmente, en embriones de *Danio rerio* se evaluaron los efectos de la exposición a TC, en el estudio de Zhang et al. en 2015, los resultados fueron una CL<sub>10</sub> de 551 mg/L y CL<sub>50</sub> de 760 mg/L a 96 hpf. Además, encontraron efectos tóxicos sobre el desarrollo, como malformaciones durante las primeras etapas de desarrollo, entre ellas absorción retrasada del saco vitelino, vejiga natatoria desinflada, longitud del cuerpo de larva más corta, a la concentración de 20 µg/L. Por otro lado, la flexión y deformación de la columna se presentó a 100 µg/L (Zhang et al., 2015). Otro estudio en embriones de *Danio rerio* mostró una CE<sub>50</sub> de 16.4 mg/L de TC a 120 hpf y una CL<sub>50</sub> de 18.3 mg/L, también a 120 hpf (Ding, 2017).

Con respecto a estudios de estrés oxidativo se han reportado aumentos del contenido de ROS en especies acuáticas como *Oncorhynchus mykiss*, *Danio rerio* y *Sparus aurata*, por exposición a OTC a 20 µg/L durante 14-21 días, también se indujo apoptosis en células de la cola a 20 µg/L de TC durante 14-21 días (Qiu, 2020; Schieber, 2014).

En otro estudio también se reportó daño al ADN en *Eisenia Foetida* a una exposición de 0.3 mg/L de tetraciclina y clortetraciclina (Dong, 2011). Y se encontró que la TC en ratas inmaduras es tóxico para el hígado y los órganos reproductivos (Yin, 2006; Farombi, 2008).

En humanos, la toxicidad de las tetraciclinas está asociada a los efectos secundarios que suele causar, los cuales pueden ser trastornos gastrointestinales, como malestar e irritación gastrointestinal, ardor epigástrico, dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea y esofagitis. Además, forma el complejo tetraciclina-calcio-ortofosfato en dientes y huesos. También se notifican con frecuencia reacciones inflamatorias como pancreatitis y en pacientes que reciben altas dosis puede producirse incluso toxicidad hepática y renal (Kanwal Rehman, 2020).

## Embriotoxicidad y teratogenicidad

En este trabajo, los efectos tóxicos que serán estudiados en los organismos son aquellos que ocurren durante las primeras etapas de desarrollo, es decir, efectos embriotóxicos y teratogénicos causados por la exposición a compuestos tóxicos.

Por un lado, la embriotoxicidad se refiere a la capacidad de una sustancia para producir efectos tóxicos en la progenie durante el desarrollo embrionario temprano, entre sus efectos se encuentran malformaciones, alteraciones de crecimiento, disfunciones fisiológicas e incluso la muerte. Por su parte, la teratogénesis se refiere específicamente a la producción malformaciones durante las primeras etapas de desarrollo (Álvarez, 2011).

Este tipo de estudios *in vivo* son de importancia debido a que permiten la evaluación directa de la toxicidad del fármaco en organismos completos en desarrollo, mediante las mediciones de absorción, distribución, metabolismo y eliminación (Bambino, 2017). Particularmente, en estudios de embriotoxicidad en peces el efecto del tóxico depende de la permeabilidad del huevo, puesto que, la exposición en estas etapas de desarrollo es dérmica, ya que el embrión aun no tiene contacto directo con el agua, que es donde se agrega directamente el tóxico (Bambino, 2017).

Por su parte, el organismo bioindicador elegido, *Danio rerio*, ha tomado un papel como modelo vertebrado en estos estudios debido a que estas sustancias afectan etapas comunes del desarrollo en los animales (Solis, 2013).

## Evaluación del desarrollo embrionario

La realización de estudios de embriotoxicidad y teratogenicidad implica la evaluación del desarrollo embrionario mediante la obtención de la  $CL_{50}$  (concentración letal media), la  $CE_{50}$  (concentración efectiva media) y la evaluación morfológica.

Por su parte, la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) está definida como la concentración estimada a la que el compuesto tóxico es letal para el 50% de los organismos del ensayo. Por otro lado, la capacidad de un tóxico de causar efectos en los organismos expuestos, es decir, la concentración estimada a la que el compuesto afecta al 50% de los organismos expuestos es la concentración efectiva media. Es a partir de estos dos datos que se puede calcular el índice teratogénico, el cual permite determinar la capacidad teratogénica de un agente y se calcula mediante la división de la  $CL_{50}$  entre la  $CE_{50}$  (Álvarez, 2011).

A su vez, la evaluación morfológica se determina mediante la evaluación del correcto desarrollo embrionario, así como por la presencia de malformaciones, retrasos en el desarrollo y anomalías. La evaluación semicuantitativa del desarrollo para embriones de *Danio rerio* fue propuesta por Hermsen, 2011, en ésta se califica el desarrollo normal de un embrión de pez cebra hasta 72 hpf (horas postfertilización), comparando a cada embrión con el de referencia descrito en 1995 por Kimmel, en esta evaluación se establecen como puntos de corte las 12, 24, 48 y 72 hpf, en cada uno de los cuales se realiza la calificación de las características distintivas de cada una de estas etapas; las malformaciones se registran únicamente como presentes o ausentes (Hermsen, 2011).

#### *Danio rerio*

Como se mencionó anteriormente, *Danio rerio*, ha resultado ser un buen bioindicador para investigaciones ambientales, en estudios acerca de los efectos que tienen los compuestos contaminantes, a concentraciones ambientalmente relevantes, sobre la salud de los vertebrados (Bambino, 2017).

El pez cebra, *Danio rerio*, es nativo del sureste asiático, se trata de un ciprínido tropical dulceacuícola (Rivera, 2006; Quintero, 2017). Los adultos de esta especie son de tamaño pequeño, de entre 4 y 6 cm de longitud; con un peso aproximado de 3g; su color de fondo puede ser dorado o plateado, tienen como característica distintiva cinco bandas longitudinales que comienzan detrás del opérculo y terminan en la aleta caudal; aleta anal rayada; su vida media se encuentra entre los 2 y 3

años (Ayala, 2014). Como características sexuales se tiene que las hembras son más grandes que los machos, así mismo, el vientre de las hembras es más voluminoso (especialmente si está cargada de huevos) (Wixon, 2000) ambos alcanzan la madurez sexual hacia el tercer mes de vida.

Este organismo fue propuesto por George Streisinger, en 1982, como modelo vertebrado para estudiar la respuesta de cancerígenos ambientales (Bambino, 2017). Después de lo cual comenzó a ser utilizado para identificar agentes teratógenos, descubrir mecanismos de acción de sustancias tóxicas y en histología para evaluar la toxicidad de compuestos en vertebrados (Gamse J. y Gorelick, 2016).

Actualmente, este organismo es considerado como un sistema biológico de alerta temprana para la detección de contaminantes en el agua, ya que, al ser una especie poco exigente puede mantenerse fácilmente en laboratorio; sin embargo, reacciona rápidamente a la presencia de contaminantes en el medio (Quintero, 2017). El empleo de *Danio rerio* para la evaluación de daño teratogénico es uno de los ensayos más comunes, pues presenta múltiples ventajas: su embriogénesis es corta (72 h), la membrana del huevo es semipermeable y traslúcida (lo cual permite observar cualquier malformación) y su ovoposición puede ser inducida (Peña, 2008). Además, comparte muchos de los genes del desarrollo con otros vertebrados, lo que lo hace un buen modelo animal para explorar el desarrollo y la genética de los vertebrados (Solis, 2013), un beneficio adicional es su alta tasa de descendencia, una hembra pone hasta 200 ovocitos por semana (Álvarez, 2011), lo cual permite una evaluación rápida de la toxicidad y la realización de estudios longitudinales a gran escala.

*Danio rerio* también es de interés para estudios toxicológicos debido a que expresa 86 genes del citocromo P450 (CYP) (Saad, 2016), los cuales son necesarios para el metabolismo de xenobióticos y para su biotransformación (Goldstone, 2009), muchas de estas enzimas están relacionadas con las humanas, lo que muestra una fuerte relación evolutiva con los humanos (Bambino, 2017).

## Alimentación en peces

En la industria acuícola cerca del 80% de costos corresponde a la dieta de los peces. Una de las fuentes proteicas para la alimentación de peces son las algas, ya que son de fácil acceso y de costo relativamente bajo (Abbas, 2020). Además, estas se pueden producir en sistemas a gran escala (Miranda, 1998).

Las algas, específicamente las microalgas, además de ser una fuente de proteína para los peces también aportan a la dieta ácidos grasos esenciales, pigmentos carotenoides, vitaminas y minerales. Igualmente, al proporcionar gran variedad de nutrientes, este alimento también tiene efectos positivos en aspectos como la fertilidad, el sistema inmune y mejora el control de peso, así como mejorar la apariencia física (mejoras en la piel y colores) (Abbas, 2020).

Entre las algas usadas como alimento para peces se encuentra la espirulina, la cual tiene un contenido proteico elevado, ya que del 55 al 70% de su peso seco es proteína, del 5-6% son lípidos, de estos últimos, los ácidos grasos poliinsaturados constituyen del 1.5 al 2%. Continuando con los lípidos presentes en esta alga, el ácido  $\omega$ -linolénico se encuentra en gran porcentaje, representando el 36% del total de los ácidos grasos poliinsaturados. Las vitaminas B1, B2, B3, B6, B9, B12, vitamina C, D y E están presentes también y minerales como K, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Se, Na y Zn, también algunos pigmentos como clorofila a, xantófila, betacaroteno, ficocianina; algunos de los cuales cuentan con actividad antioxidante y enzimas como la lipasa. Por ejemplo, la ficocianina tiene propiedades tanto antioxidantes como antiinflamatorias (Abbas, 2020). Debido al creciente interés en encontrar sustancias eficientes para prevenir el daño oxidativo causado por los radicales libres han comenzado a buscarse y estudiarse sustancias y sus fuentes de obtención para minimizar el daño oxidativo a las células (Miranda, 1998). Otra ventaja de la espirulina es que, a diferencia de otras algas, ésta no tiene pared celular, lo cual resulta en una mejor digestión y absorción de los nutrientes. Entre los cambios visibles en los organismos alimentados con espirulina, como los conductuales, se han reportado peces con más apetito que aquellos alimentados

con alimento comercial, también presentan mayor resistencia a ser cazados y movimientos más rápidos ante la caza. Por otro lado, en cuanto a características físicas se ha observado, en carpa común alimentada con espirulina pura, que su piel es más liviana que la de los organismos alimentados con alimentos comercial (Abbas, 2020).

Como antecedentes del uso de espirulina en alimento de peces y sus efectos benéficos se tiene, por ejemplo, el estudio de Abdelkhalek *et al.* en 2015 se ha demostrado que la administración de *S. platensis* redujo los efectos tóxicos causados por la exposición a deltametrina en *Oreochromis niloticus*, en ese estudio concluyeron que esta disminución se debe al efecto antioxidante del alga.

Además, en el estudio de Abbas, 2020, se reportó que una dieta pura de *S. platensis* tuvo incrementa el tamaño en carpa común, medido en el peso, el valor medio de peso y desviación estándar resultaron de  $69.34 \pm 2.83$ , presentado mayor significancia que el resto de los tratamientos, los cuales eran T1: dieta de espirulina 100% pura, T2: espirulina al 3%, T3: espirulina al 1.5% y T4: dieta comercial (Abbas, 2020). Según el mismo estudio, la adición de espirulina en dietas de peces mejoró el crecimiento en términos de aumento de peso, así como la tasa de supervivencia de los peces en carpa común (*C. carpio*), alevines de *O. niloticus* y *Catla catla* (Abbas, 2020).

La alimentación y su contenido nutricional tienen efectos directos tanto en el desarrollo como en la fecundidad gonadal de los peces. De hecho, para *Danio rerio* existen recomendaciones específicas para alimentarlos antes del desove. El estudio de Marcovich, en 2007, realizó pruebas de fecundidad, reproducción y desarrollo con cuatro dietas distintas en *Danio rerio*; la dieta 1 consistió en una mezcla de *Artemia sp.*, alimento comercial en polvo y pasta de hígado; la dieta 2 fue de *Artemia sp.* únicamente; la dieta 3 fue un alimento en hojuela y la dieta 4 fue un alimento para trucha, igualmente comercial. Finalmente, el estudio concluyó que la dieta del pez si tiene un impacto significativo tanto en la cantidad de huevos puestos como

en la longitud de las larvas. Los peces alimentados con la dieta 1 produjeron significativamente menos huevos que los de las demás dietas; el porcentaje de huevos de peces alimentados con la dieta 3 fue significativamente mayor que el de los alimentados con la dieta 4. Sin embargo, la longitud de las larvas fue significativamente mayor en los alimentados con la 1 (14.5 mm) en comparación con las larvas de los alimentados con *Artemia sp.* (13.7 mm).

La actividad antioxidante de la espirulina se reportó en el estudio de Miranda, en 1998, donde se evaluó la capacidad antioxidante *in vivo* del plasma de ratas que recibieron una dosis diaria de 5 mg de extracto de espirulina (2 -7 semanas) en homogenizado de cerebro e hígado, dicha capacidad antioxidante se midió en términos de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). La capacidad antioxidante del plasma resultó ser del 71% para el grupo experimental y del 54% para el grupo control. En el estudio concluyeron que la espirulina proporciona cierta protección antioxidante (Miranda, 1998).

## **Planteamiento del problema**

El recurso más importante para la vida sin duda es el agua y, debido a que se hace un uso intensivo de la misma, su contaminación se vuelve uno de los más grandes problemas ambientales y de salud. Es una de las problemáticas más difíciles de solucionar actualmente, ya que, con la introducción de nuevas sustancias en el ambiente, para las cuales no se cuenta con un tratamiento de eliminación, es difícil discernir para cuáles de ellas será prioritaria una regulación, para ello, se toman en consideración los posibles efectos tóxicos sobre los organismos acuáticos.

Los compuestos contaminantes llegan a los cuerpos de agua a través de diferentes vías, como lo son el escurrimiento de las aguas residuales de la ganadería y la agricultura, el agua residual de procesos industriales, el agua de uso doméstico y hospitalario que se mezclan en el alcantarillado, el cual posteriormente desemboca esta agua residual sin tratamiento previo en los ambientes acuáticos, principalmente en países en vías de desarrollo como lo es México. Por otro lado, aunque el agua

vaya a plantas de tratamiento, existen contaminantes que no son eliminados de forma parcial o en su totalidad ya que no se encuentran regulados por la legislación, es por esta misma razón, y debido a su uso constante, que se mantienen presentes en el ambiente. Estos contaminantes, aunque han estado presentes en el ambiente anteriormente, han sido recientemente notados y se han comenzado a realizar estudios sobre los mismos, son llamados contaminantes emergentes.

Entre los contaminantes emergentes uno de los grupos que más preocupación causan es el grupo de los fármacos, debido a su constante uso, por lo que su concentración en los medios acuáticos va en aumento, al no estar regulados y no tener un tratamiento específico para estos, se siguen acumulando. Por su parte, el grupo de los antibióticos es de los más usados. Específicamente, el grupo de las tetraciclinas ocupa el segundo lugar en producción y uso a nivel mundial. Se ha reportado la presencia de tetraciclina en cuerpos de agua alrededor del mundo en concentraciones que van desde 9.1 hasta 48,000 ng/L.

Estudios acerca de estos compuestos han mostrado que son precursores de efectos negativos en los organismos, si estos efectos se presentan durante el desarrollo embrionario generan embriotoxicidad y teratogenicidad, manifestándose con la muerte de los organismos y con malformaciones en los mismos. Estos estudios son de referencia para la regulación de sustancias prioritarias y para la creación de una normatividad enfocada en dar el tratamiento adecuado a los recursos hídricos.

Debido a lo mencionado anteriormente, al conocerse el riesgo de la presencia de sustancias exógenas en el ambiente, se busca la manera en la que se puedan disminuir los efectos adversos, donde la intervención de sustancias capaces de contrarrestar estos efectos sería una alternativa, estas pueden ser vitaminas, minerales, antioxidantes y antiinflamatorios, los cuales han demostrado proteger a las biomoléculas del daño causado por los contaminantes y disminuir los efectos tóxicos de éstos una vez que entran al organismo. Éstas sustancias protectoras podrían llegar a los organismos mediante su suplementación en la alimentación.

## **Pregunta de investigación**

¿Qué efecto tiene la suplementación de un alimento funcional, enriquecido con antioxidantes, vitaminas y minerales, en los progenitores sobre los efectos tóxicos inducidos por la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de tetraciclina en embriones de *Danio rerio*?

## **Hipótesis**

La alimentación enriquecida con antioxidantes, vitaminas y minerales de los progenitores reducirá los efectos tóxicos inducidos por la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de tetraciclina sobre los embriones de *D. rerio*.

## **Objetivos**

Objetivo General:

Evaluar la embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por concentraciones ambientalmente relevantes de tetraciclina en embriones de *Danio rerio* y determinar la influencia de un alimento funcional enriquecido con antioxidantes, vitaminas y minerales sobre los efectos tóxicos.

Objetivos Específicos:

- a) Determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), la concentración efectiva media de malformaciones ( $CE_{50\text{malformaciones}}$ ) y el índice teratogénico (IT) para embriones de *Danio rerio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de tetraciclina, antes y después de la suplementación subcrónica del alimento en los progenitores.

b) Evaluar los efectos teratogénicos producidos por concentraciones ambientalmente relevantes de tetraciclina en embriones de *Danio rerio* antes y después de la suplementación subcrónica del alimento.

## Metodología

### Variables

Variable	Tipo de variable	Definición de la variable
Concentración del fármaco	Independiente	Cuantitativa, continua
Alimentación	Independiente	Cualitativa, nominal
Mortalidad	Dependiente	Cuantitativa, discreta
Malformaciones	Dependiente	Cuantitativa, discreta
Índice teratogénico	Dependiente	Cuantitativa, continua
Puntuación de morfología	Dependiente	Semicuantitativa, discreta

### Reactivos

El clorhidrato de tetraciclina, ((4S, 4aS, 5aS, 6S, 12aR) -4- (dimetilamino) - 1,6,10,11,12a-pentahidroxi-6-metil-3,12-dioxo-4,4a, 5, 5a-tetrahidrotetraceno-2-carboxamida (hidrocloruro), se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), con una pureza del 98%,  $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ , un peso molecular de 480.90 (número CAS 66-75-5).

Este estudio se basó en la Guía de la OCDE para la prueba de productos químicos 236: Prueba de toxicidad aguda en embriones de pez.

### Mantenimiento de los progenitores

Los progenitores fueron peces en edad reproductiva (mayores a 3 meses de edad), obtenidos de manera comercial, de tipo salvaje, de entre 4 y 5 cm de longitud, libres de síntomas de infección y enfermedad. Primero se estandarizaron las condiciones necesarias para mantenerlos y las condiciones para asegurar la reproducción, se realizaron pruebas previas para conocer la tasa de fertilidad del grupo. Los

reproductores se mantentuvieron en acuarios de 80L, manteniendo un pez por cada 1L de agua, en peceras distintas machos y hembras, con un fotoperíodo natural y temperatura de 27°C. Los peces reproductores se dividieron en dos grupos, uno de ellos se alimentó con alimento en hojuelas comercial, el otro grupo se alimentó con el alimento funcional enriquecido con antioxidantes, vitaminas y minerales durante seis meses previos a la fecha de desove. Se realizó limpieza y recambio de agua cada tres días (OECD, 2013).

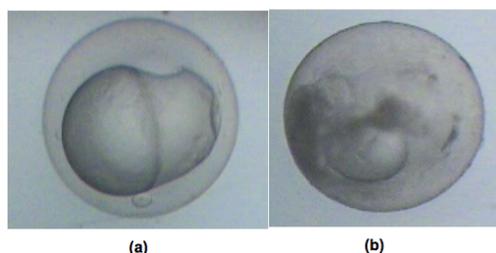
### Producción de huevos

Se colocaron tanques de desove, los cuales constaron de un contenedor transparente de 15L de capacidad, donde se colocaron 10L de medio (agua corriente, sales marinas de la marca comercial Instant Ocean a la concentración indicada por el fabricante de 0.09 mg/L y anticloro) previamente aireado, un termostato para mantener una temperatura de 27°C. Dentro de estos contenedores se colocó una caja de malla con un poro de 5 mm, donde permanecieron los progenitores, esto sirvió como trampas de desove, evitando que los adultos depredaran los huevos.

En los tanques se colocaron los organismos adultos: hembras y machos en una proporción de 2:1 respectivamente. Los tanques se colocaron a las 17 horas del día previo a la prueba. Se usaron tres tanques de desove para evitar el sesgo genético. El apareamiento, desove y fertilización tuvieron lugar después de 30 minutos del inicio de la luz del día siguiente. Los huevos fueron recolectados, mezclados y seleccionados al azar.

Para la recolección de los huevos se retiraron las trampas de desove cuidadosamente. Después, mediante succión con bulbos de plástico se colectaron todos los huevos, se transfirieron directamente a solución fisiológica para enjuagarlos, después fueron colocados en placas Petri con medio (anteriormente mencionado). En seguida se observaron al microscopio para separar los viables de los no viables, estos últimos se desecharon, únicamente se usaron para exposición

al tóxico aquellos embriones que estaban fertilizados y no coagulados, como se muestra en la (Fig. 2).



**Figura 2. a) Huevo viable de *Danio rerio* y b) Huevo no viable (Peña, 2008).**

### Exposición al tóxico

Se realizaron pruebas de letalidad a distintas concentraciones, posteriormente se eligieron diez concentraciones y los organismos se expusieron a éstas. Esto en placas de 24 pozos, con 2 ml de medio con las distintas concentraciones y para el control negativo únicamente el medio, el cual estaba previamente aireado durante las 48 horas anteriores a la colocación de los huevos. Los huevos se incubaron a temperatura constante de  $27^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . La prueba se inició a las 4 horas después de la fertilización de los huevos y finalizó a las 96 horas de exposición.

Las concentraciones que se usaron en las pruebas fueron 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 ng/L de tetraciclina para ambos grupos de embriones.

### Embrioletalidad

La  $CL_{50}$  se determinó al observar los embriones en el microscopio estereoscópico para determinar su viabilidad, esto en cada una de las concentraciones y en un grupo control libre del tóxico, la cuantificación del total de organismos vivos y muertos en cada tratamiento se obtuvo a las 96 horas post-fertilización (hpf). A los diferentes tiempos de observación (12, 24, 48, 72 y 96 hpf) se cuantificaron los embriones coagulados (son de color blanco y oscuros) o muertos (sin latido del corazón ni movimiento). Con estos datos la  $CL_{50}$ , se obtuvo al realizar el análisis Logit, con un límite de confianza del 95%, usando el software SPSS. Por otro lado,

la  $CE_{50}$  se determinó con los datos de la cuantificación de organismos malformados, ésto también a lo largo de los diferentes tiempos de observación, el total de organismos malformados se obtuvo a las 96 hpf; después de lo cual se realizó igualmente el análisis Logit.

El índice teratogénico se calculó como el cociente entre la  $CL_{50}$  y la  $CE_{50}$ malformaciones, el valor obtenido determina si el compuesto se considera como teratogénico, es decir, un resultado  $>1$  indica que el fármaco es considerado como teratogénico; de lo contrario se considera que el fármaco produce principalmente efectos letales (Luja, 2019).

#### Evaluación del desarrollo embrionario

Durante cada uno de los tiempos de observación (12, 24, 48, 72 y 96 hpf), se realizó, a la par de la cuantificación de organismos muertos y malformados, la evaluación del desarrollo de cada uno de los embriones, ésto basado en la escala propuesta por (Hermsen, 2011). La evaluación fue semicuantitativa, se evaluó la presencia, ausencia o correcto desarrollo de características morfológicas específicas de cada uno de los puntos de desarrollo, esto mediante la comparación de los embriones expuestos contra el embrión de referencia descrito por Kimmel en 1995, los embriones recibieron o perdieron puntos por cada uno de los factores a evaluar acuerdo con la tabla de puntajes de Hermsen, 2011. Las características que fueron evaluadas son las siguientes, cada una al tiempo en el que debía comenzar a evaluarse: desarrollo de la cola, desarrollo ocular, formación de somitas, movimiento, latido de corazón, circulación sanguínea, pigmentación cabeza-cuerpo, pigmentación de la cola, aparición de aleta pectoral, protuberancia bucal y eclosión; por cada anomalía o retraso se restó un punto (Hermsen, 2011).

#### Evaluación de malformaciones y efectos teratogénicos

La cuantificación de los organismos con efectos teratogénicos, así como la cuantificación de cada una de las malformaciones, igualmente se realizó a través

de la observación en el microscopio. Se observaron los organismos, tanto del grupo testigo como los expuestos al fármaco, para buscar la presencia de malformaciones que han sido reportadas en *Danio rerio*: edema pericárdico, edema ocular, edema del saco vitelino, malformación de la cabeza, malformación de cola, malformación de corazón, estructura de cuerda modificada (escoliosis), malformación de otolitos, raquisquisis y deformación de la yema (Hermsen, 2011). Finalmente, se tomaron fotografías como evidencia de las malformaciones más representativas.

#### Análisis estadístico

La comparación estadística entre la mortalidad y la cantidad de organismos malformados en ambos grupos se realizó con una prueba t de Student. Para comparar el desarrollo, evaluado mediante el puntaje de morfología general de Hermsen, 2011, entre los organismos expuestos y el grupo control se realizó el análisis estadístico ANOVA en el programa estadístico SPSS, con un nivel de confianza del 95%.

#### Consideraciones bioéticas

Según el Consejo Canadiense de Cuidado de Animales (Canadian Council on Animal Care, Guidelines on: Procurement of animals used in science, 2007), en 2007, los estándares éticos y el muestreo de larvas de peces que no se han desarrollado más allá de la dependencia exclusiva de sus propios nutrientes, no requiere una aprobación ética. Por otro lado, según el SABS (South African Bureau of Standards, 2008), los vertebrados vivos, incluidos los huevos, fetos y embriones de peces, deben ser utilizados de manera científica, técnica y humanamente apropiada. Además, ya que las investigaciones con embriones y larvas de peces implican el sacrificio de un gran número de organismos, se debe considerar minimizar los tamaños de muestra (Canadian Council on Animal Care, Guidelines on: The care and use of fish in research, teaching and testing, 2005).

En cuanto a los métodos de eutanasia aceptables para larvas de peces son la inmersión en hielo o en un fijador como etanol o formalina; con los organismos previamente anestesiados (Craig, 2006).

## Resultados

La mortalidad de los embriones está reportada en las **Tabla 3.** y **Tabla 4.** En la primera se presenta la cantidad de organismos muertos en cada una de las concentraciones de TC a las que se expusieron los embriones procedentes de los progenitores alimentados con el alimento funcional, así como el porcentaje representativo de los mismos con respecto al número total de organismos expuestos, se puede observar que la mortalidad de los embriones aumenta de manera dosis-dependiente, así el máximo porcentaje de mortalidad fue del 31.67% y se presentó en las tres concentraciones más elevadas. El análisis Logit, en el software SPSS, estimó que la  $CL_{50}$  de tetraciclina, para éste grupo, resultó de 5,888.049 ng/L. En la **Tabla 5.** se resumen el número de organismos con al menos una malformación, el porcentaje que representan con respecto al número total de organismos expuestos a cada una de las concentraciones de TC a las que se expusieron los organismos cuyos padres fueron alimentados únicamente con alimento comercial. En este caso el número de embriones con malformaciones no tuvo un comportamiento dosis-dependiente, ya que fue en aumento en las primeras concentraciones, desde los 50 ng/L hasta los 300 ng/L, llendo del 33.33% al 56.67%, respectivamente, para después disminuir en la concentración de 350 ng/L al 31.67% y comenzar nuevamente a aumentar desde los 400 ng/L hasta los 500 ng/L de TC. Así mismo, el análisis Logit permitió calcular la  $CE_{50\text{malformaciones}}$ , que resultó ser de 1,536.087 ng/L. Con los valores obtenidos de la  $CL_{50}$  y la  $CE_{50\text{malformaciones}}$  se calculó el índice teratógeno de la tetraciclina en este grupo de embriones y resultó de 4.228, lo cual indica que este compuesto es teratógeno.

Por otro lado, en la **Tabla 4.** se observan los resultados de la mortalidad de los organismos cuyos progenitores fueron alimentados con alimento comercial, en este caso el mayor porcentaje de organismos muertos resultó de 38.33% y se presentó a las concentraciones de 350 y 400 ng/L de TC, de manera que en este grupo la

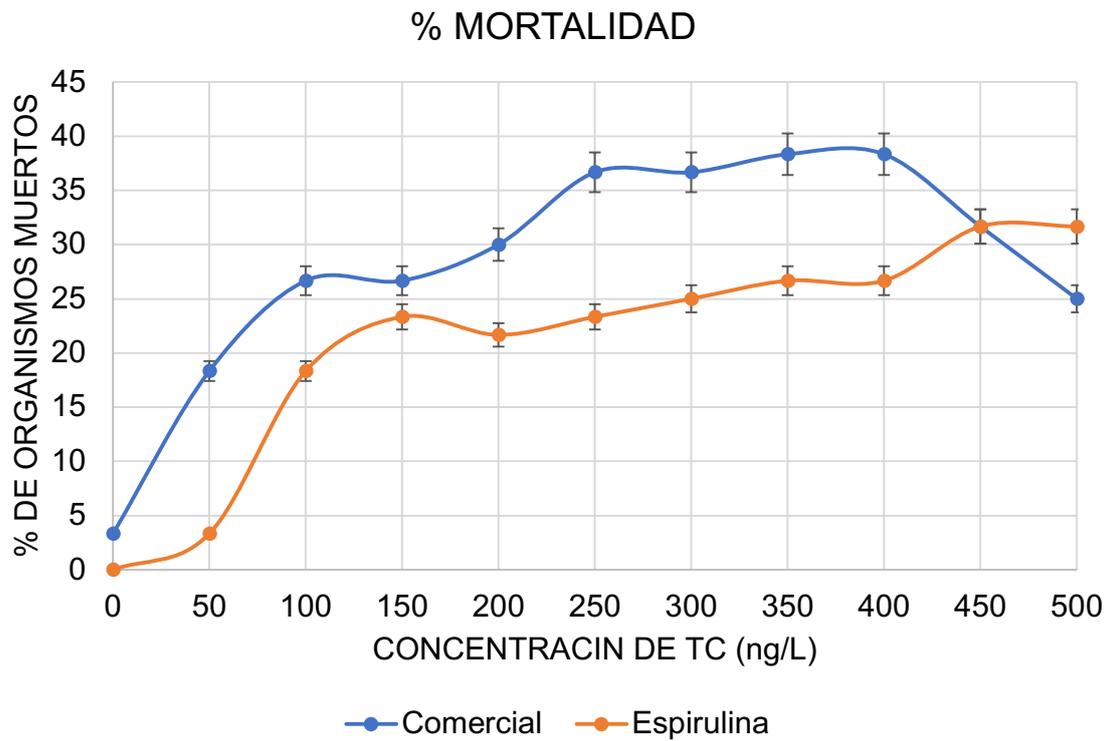
mortalidad fue en aumento de manera dosis-dependiente desde a primera concentración (50 ng/L) hasta 350 ng/L, el porcentaje se mantuvo en la siguiente concentración y finalmente disminuye en las dos concentraciones más altas. La realización del análisis Logit, en el software SPSS, permitió estimar la  $CL_{50}$  de tetraciclina, la cual resultó ser de 3,378.966 ng/L, para éste grupo. El porcentaje de mortalidad es expresado gráficamente en la **Figura 3**. Donde se puede observar que hay un mayor porcentaje de organismos muertos en el alimento comercial en casi todas las concentraciones. En el alimento comercial se puede observar un aumento en la mortalidad de manera dosis-dependiente desde la concentración de 50 ng/L hasta los 400 ng/L y comenzó a disminuir en las últimas dos concentraciones. Por otro lado, en el uso del alimento funcional con espirulina el porcentaje de mortalidad fue en aumento con la concentración de TC en este caso desde la primera concentración de 50 ng/L hasta la última de 500 ng/L. La prueba t de Student arrojó que no existen diferencias estadísticamente significativas, con un nivel de significancia del 5%, ya que el valor de resultó  $p= 0.284$ , y el valor  $t= 1.101$ , en una prueba de t de dos colas para muestras independientes suponiendo varianzas iguales. El análisis Logit permitió calcular la  $CE_{50malformaciones}$ , que resultó ser de 799.227 ng/L. En este grupo, igualmente, con los valores obtenidos de la  $CL_{50}$  y la  $CE_{50malformaciones}$  se calculó el índice teratogénico de la tetraciclina, el cual en éste caso resultó de 3.833, indicando que también en este grupo la tetraciclina es considerada como teratogénica.

**Tabla 3.** Mortalidad de embriones, alimento funcional.

<b>MORTALIDAD ALIMENTO ESPIRULINA</b>			
<b>CONCENTRACIÓN TC (NG/L)</b>	<b>Número de muertos</b>	<b>% de muertos</b>	<b>Organismos expuestos</b>
0	2	3.33	60
50	11	18.33	60
100	14	23.33	60
150	13	21.67	60
200	14	23.33	60
250	15	25.00	60
300	16	26.67	60
350	16	26.67	60
400	19	31.67	60
450	19	31.67	60
500	19	31.67	60

**Tabla 4.** Mortalidad embriones, alimento comercial.

<b>MORTALIDAD ALIMENTO COMERCIAL</b>			
<b>CONCENTRACIÓN TC (NG/L)</b>	<b>Número de muertos</b>	<b>% de muertos</b>	<b>Organismos expuestos</b>
0	2	3.33	60
50	11	18.33	60
100	16	26.67	60
150	16	26.67	60
200	18	30.00	60
250	22	36.67	60
300	22	36.67	60
350	23	38.33	60
400	23	38.33	60
450	19	31.67	60
500	15	25.00	60



**Figura 3.** Gráfica de comparación entre el porcentaje de mortalidad de ambos grupos de embriones.

**Tabla 5.** Malformaciones en embriones, alimento comercial.

<b>MALFORMACIONES ALIMENTO COMERCIAL</b>			
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>Número de malformados</b>	<b>% de malformados</b>	<b>Organismos expuestos</b>
0	0	0	60
50	20	33.33	60
100	19	31.67	60
150	25	41.67	60
200	25	41.67	60
250	27	45.00	60
300	34	56.67	60
350	19	31.67	60
400	23	38.33	60
450	28	46.67	60
500	31	51.67	60

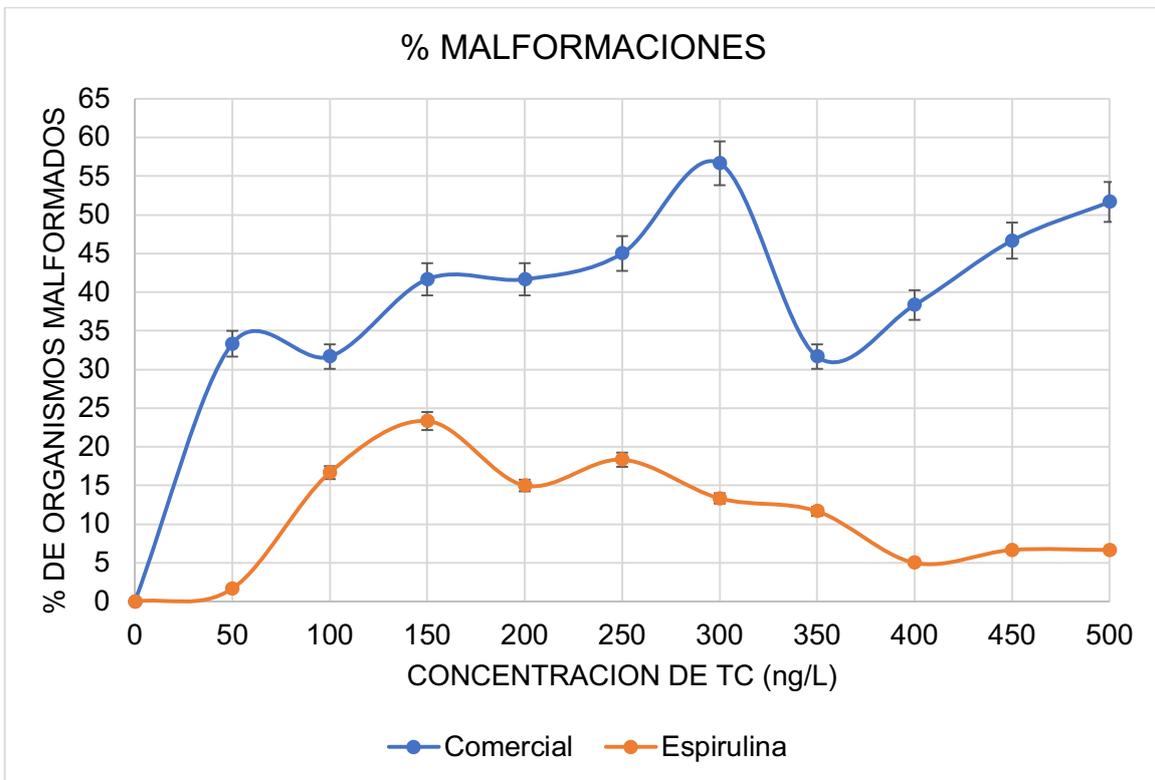
Del mismo modo, el resumen del número y porcentaje de organismos con al menos una malformación cuyos padres fueron alimentados con el alimento funcional se presenta en la **Tabla 6**. Para este caso el número de embriones con malformaciones aumentó desde la primera concentración de 50 ng/L hasta la de 150 ng/L, llendo del 1.67% al 23.33%, respectivamente, pero posteriormente fue disminuyendo con la concentración de TC, llendo desde el 15.00% a los 200 ng/L hasta alcanzar el 5.00% en la concentración de 400 ng/L para finalmente, en las dos últimas concentraciones, de 450 y 500 ng/L aumentar ligeramente a un 6.67% en ambas. La  $CE_{50\text{malformaciones}}$ , calculada mediante el análisis Logit en el software SPSS, resultó de 1,536.087 ng/L.

La **Figura 4**. muestra de manera gráfica la comparación entre el porcentaje de organismos malformados de ambos grupos de embriones. Se observa un aumento en el porcentaje de organismos malformados en el alimento comercial en todas las concentraciones. En los embriones de padres alimentados con el alimento comercial se puede observar que el aumento en el porcentaje de organismos con al menos una malformación fue de manera dosis-dependiente desde la concentración de 50 ng/L hasta la de 300 ng/L, disminuyó en la de 350 ng/L y comenzó a aumentar nuevamente a partir de la concentración de 400 ng/L. Por otro lado, en el caso de los embriones del alimento funcional el porcentaje de organismos malformados fue en aumento solo desde la primera concentración de 50 ng/L hasta la de 150 ng/L, para posteriormente comenzar a disminuir de desde los 200 ng/L hasta la última de concentración. Finalmente, la prueba t de Student arrojó que si existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, con un nivel de significancia del 5%, el valor de p resultante fue  $< 0.001$ , y el valor de  $t = 5.432$ , en una prueba de t de dos colas para muestras independientes suponiendo varianzas iguales.

**Tabla 6.** Malformaciones en embriones, alimento funcional.

**MALFORMACIONES ALIMENTO CON ESPIRULINA**

CONCENTRACIÓN	Número de malformados	% de malformados	Organismos expuestos
0	0	0	60
50	1	1.67	60
100	10	16.67	60
150	14	23.33	60
200	9	15.00	60
250	11	18.33	60
300	8	13.33	60
350	7	11.67	60
400	3	5.00	60
450	4	6.67	60
500	4	6.67	60



**Figura 4.** Gráfica de comparación entre el porcentaje de organismos malformados de ambos grupos de embriones.

En la **Tabla 7.** y la **Figura 5.** se muestran el resumen y los datos en gráfica de los promedios obtenidos en la evaluación de Hermsen, 2011, a los cinco distintos tiempos de observación (12, 24, 48, 72 y 96 hpf) en cada una de las concentraciones de TC a las que fueron expuestos, en este caso del grupo de embriones del alimento comercial. De acuerdo con la prueba estadística ANOVA, donde se obtuvo un valor de  $p < 0.001$  y un valor crítico para F de 3.819, se concluye que sí existen diferencias estadísticamente significativas en al menos uno de grupos, con un nivel de significancia del 5%. Posteriormente, la prueba Post Hoc de elección fue la prueba de Tukey, la cual arrojó que las diferencias entre grupos estaban dadas entre el grupo control y las concentraciones 150, 200, 250, 300, 350, 400 y 450 ng/L.

**Tabla 7.** Promedios de las puntuaciones de la escala de desarrollo, de acuerdo con Hermsen, 2011, a los distintos tiempos de observación, en cada una de las concentraciones, en el grupo de embriones del alimento comercial.

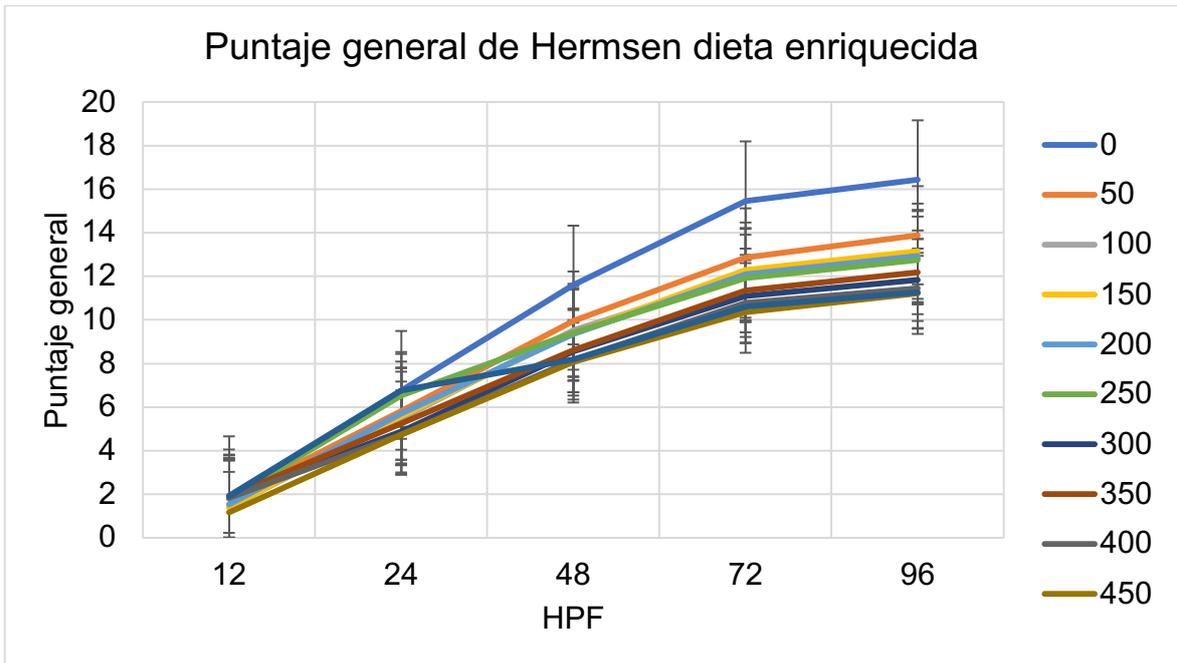
<b>HERMEN COMERCIAL</b>	<b>12 HPF</b>	<b>24 HPF</b>	<b>48 HPF</b>	<b>72 HPF</b>
<b>CONTROL</b>	0.967	6.767	11.600	14.500
<b>50 NG/L</b>	0.850	5.600	9.500	11.867
<b>100 NG/L</b>	0.683	5.050	8.033	10.783
<b>150 NG/L</b>	0.783	6.200	10.533	10.783
<b>200 NG/L</b>	0.633	5.717	9.383	9.483
<b>250 NG/L</b>	0.567	6.467	7.300	8.783
<b>300 NG/L</b>	0.667	4.517	7.383	8.583
<b>350 NG/L</b>	0.633	4.217	7.500	8.733
<b>400 NG/L</b>	0.600	4.633	7.817	8.717
<b>450 NG/L</b>	0.583	4.750	8.067	9.733
<b>500 NG/L</b>	0.667	6.600	10.917	10.867

Por otra parte, en la **Tabla 8.** y la **Figura 6.** se muestran el resumen y los datos en gráfica de los promedios obtenidos en la evaluación de Hermsen, en cada una de las concentraciones de TC pero este caso del grupo de embriones del alimento funcional. La prueba estadística ANOVA arrojó un valor de  $p = 0.006$  y un valor crítico para F = 2.510, se concluye que sí existen diferencias estadísticamente significativas

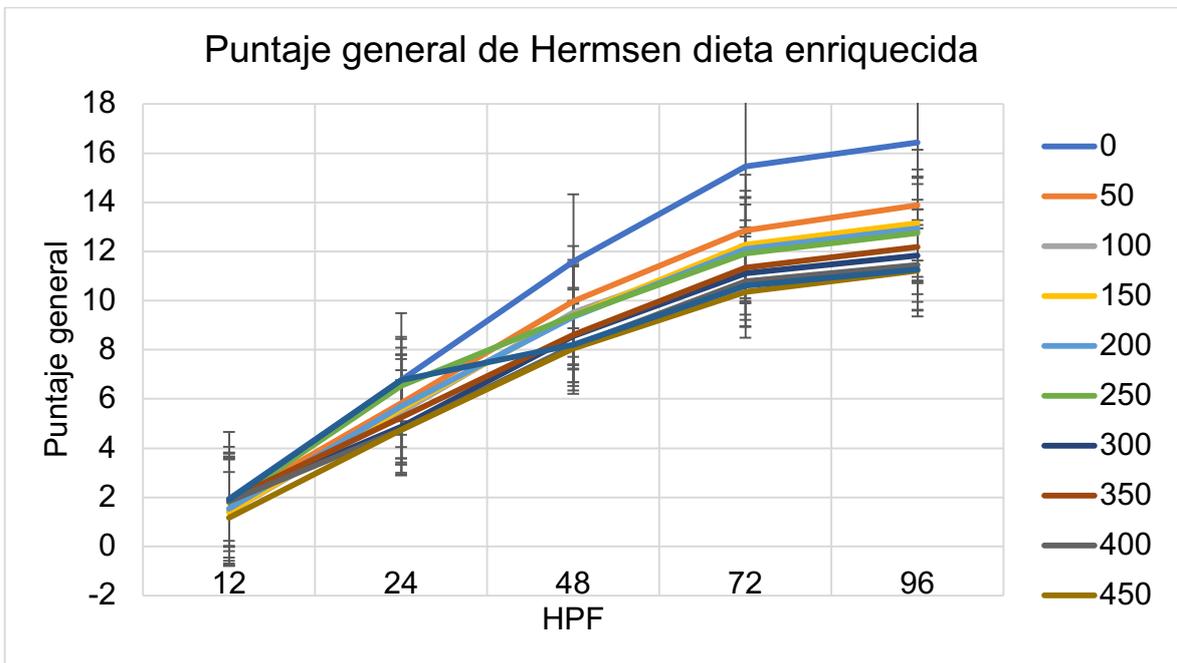
entre al menos uno de los grupos, con un nivel de significancia del 5%. Posteriormente, en la prueba Post Hoc, prueba de Tukey, se encontró que las diferencias entre grupos estaban dadas entre el grupo control y las concentraciones 300, 350, 400, 450 y 500 ng/L.

**Tabla 8.** Promedios de las puntuaciones de la escala de desarrollo, de acuerdo con Hermesen, 2011, a los distintos tiempos de observación, en cada una de las concentraciones, en el grupo de embriones del alimento funcional.

<b>HERMSEN ESPIRULINA</b>	<b>12 HPF</b>	<b>24 HPF</b>	<b>48 HPF</b>	<b>72 HPF</b>
<b>CONTROL</b>	0.983	6.883	11.800	14.750
<b>50 NG/L</b>	0.900	5.833	9.967	12.050
<b>100 NG/L</b>	0.700	5.483	9.517	11.300
<b>150 NG/L</b>	0.700	5.600	9.383	11.300
<b>200 NG/L</b>	0.767	5.700	9.350	11.350
<b>250 NG/L</b>	0.900	6.533	9.400	11.167
<b>300 NG/L</b>	0.950	4.883	8.567	10.450
<b>350 NG/L</b>	0.950	5.250	8.600	10.633
<b>400 NG/L</b>	0.917	4.750	8.167	10.133
<b>450 NG/L</b>	0.933	4.983	8.400	10.100
<b>500 NG/L</b>	0.950	6.767	8.200	9.950



**Figura 5.** Puntuaciones de la escala de desarrollo, de acuerdo con Hermsen, 2011, en el grupo de embriones del alimento comercial.



**Fig. 6.** Puntuaciones de la escala de desarrollo, de Hermsen, 2011, en el grupo de embriones del alimento funcional.

La **Tabla 9.** muestra fotografías de las malformaciones más comunes reportadas en los embriones de ambos grupos las cuales son: edema pericárdico, ausencia de aleta pectoral, ausencia de cabeza, hemorragia, oscurecimiento del saco vitelino, ausencia de cola, malformación de cola, no eclosionado, malformación de ojo, malformaciones craneofaciales y malfomación de corda.

**Tabla 9.** Malformaciones frecuentemente encontradas en los organismos expuestos a tetraciclina en ambos grupos de alimento.

Malformación	Imagen representativa
<b>Edema pericárdico</b>	
<b>Ausencia de aleta pectoral</b>	

**Ausencia de cabeza**



**Hemorragia**



**Oscurecimiento del saco vitelino**



**Ausencia de cola**



**Malformación de cola**



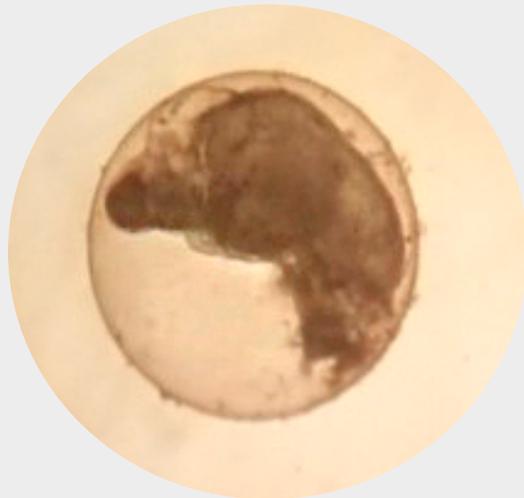
**No eclosionado**



**Malformación de ojo**



**Malformaciones craneofaciales**

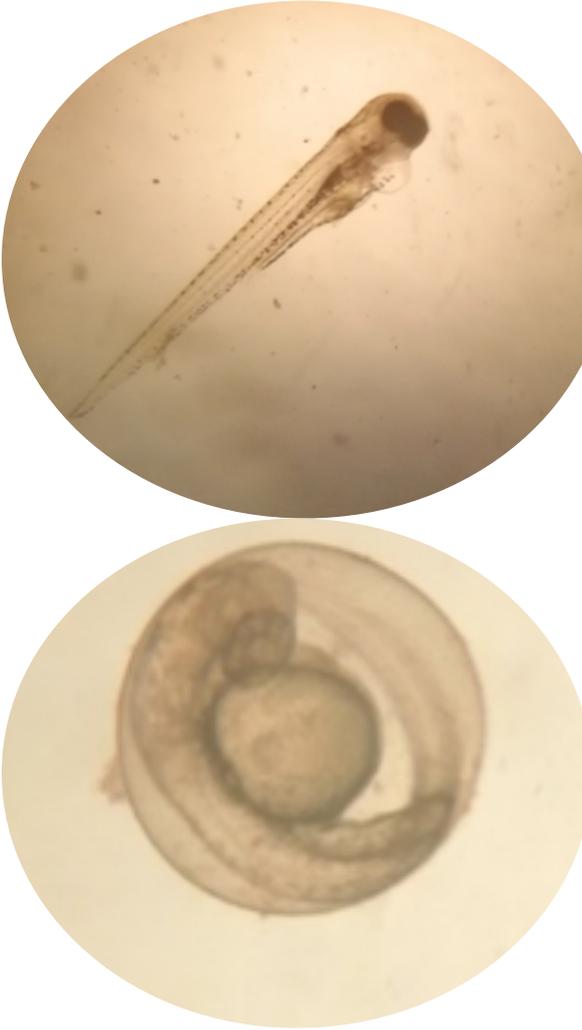


**Malformación de corda**



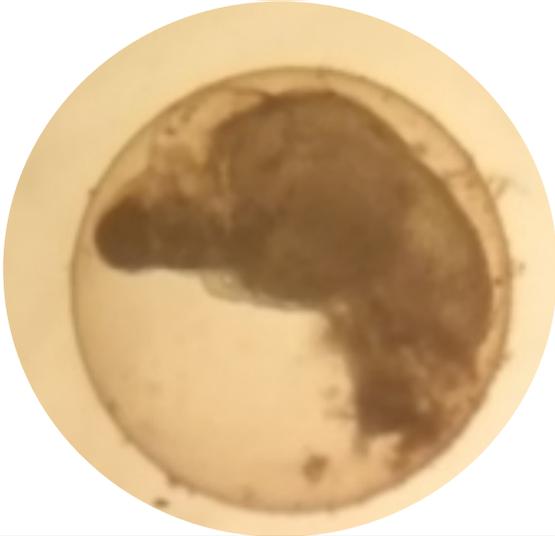
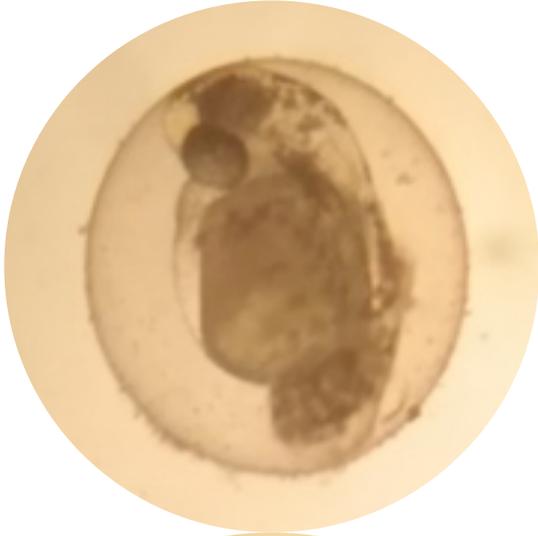
En la **Tabla 10**. Se muestran las malformaciones que se presentaron a cada una de las concentraciones de tetraciclina, en cada uno de los grupos de manera comparativa.

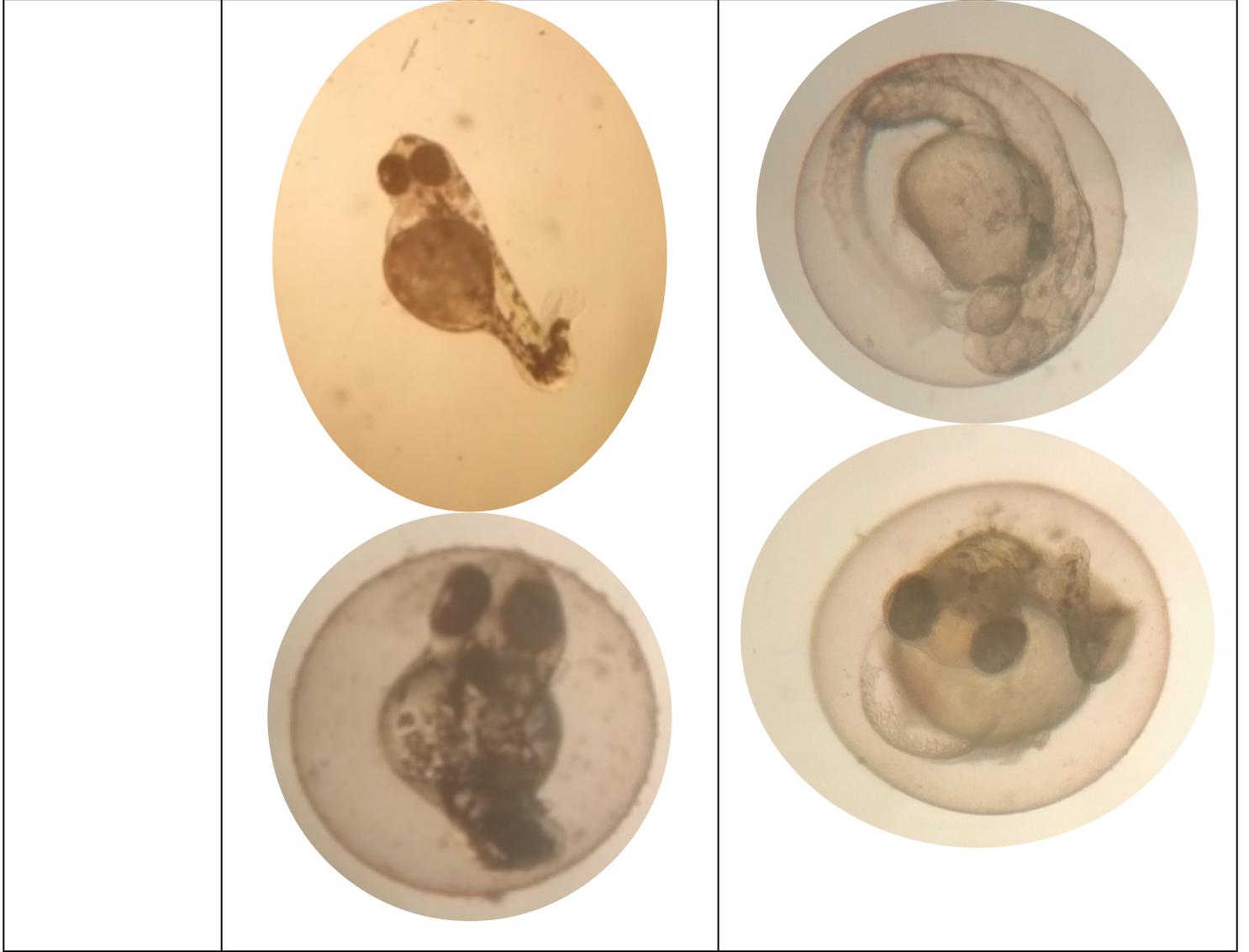
**Tabla 10.** Malformaciones presentadas en cada concentración, comparación de ambos grupos.

Concentración	Normal	Espirulina
50		

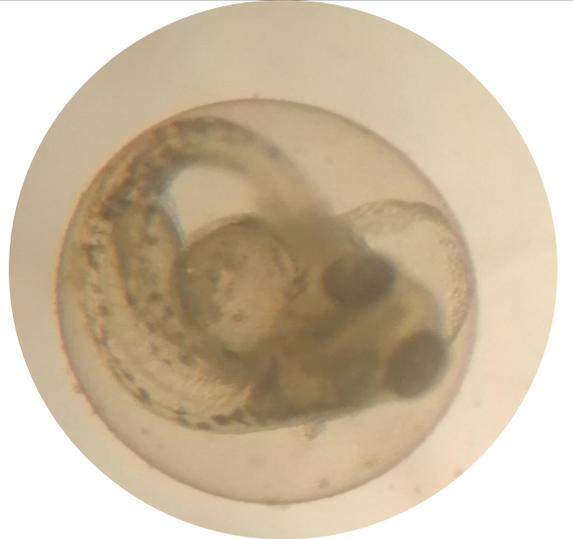
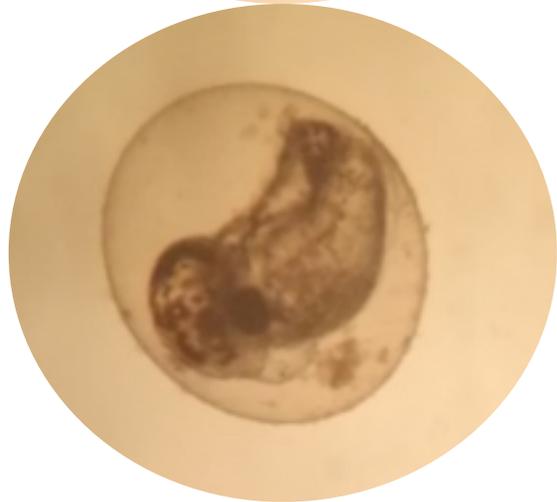
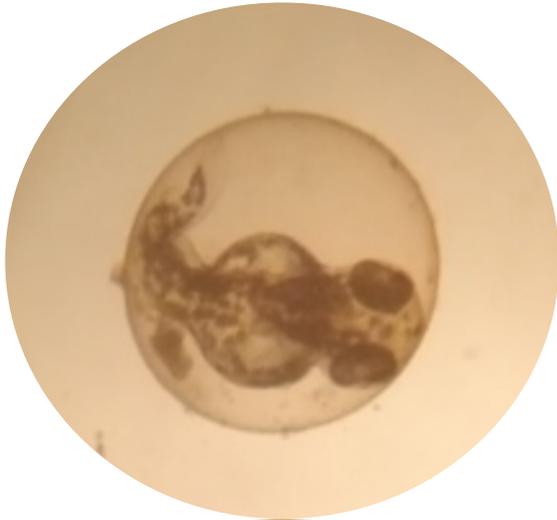


100

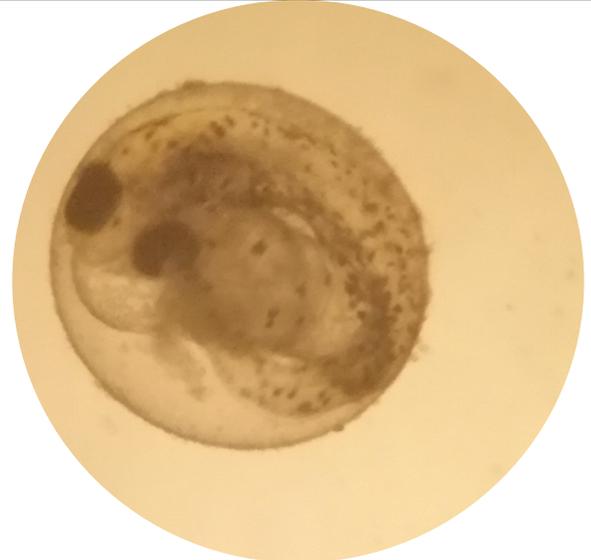




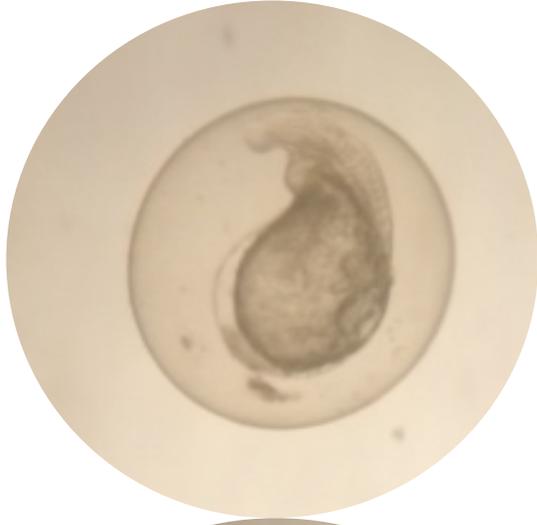
150

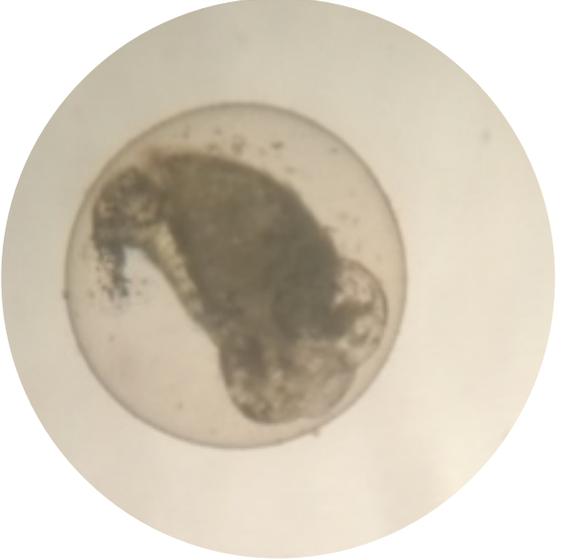
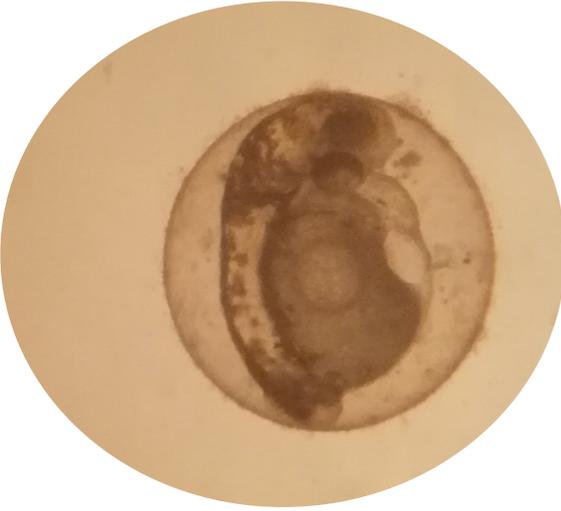


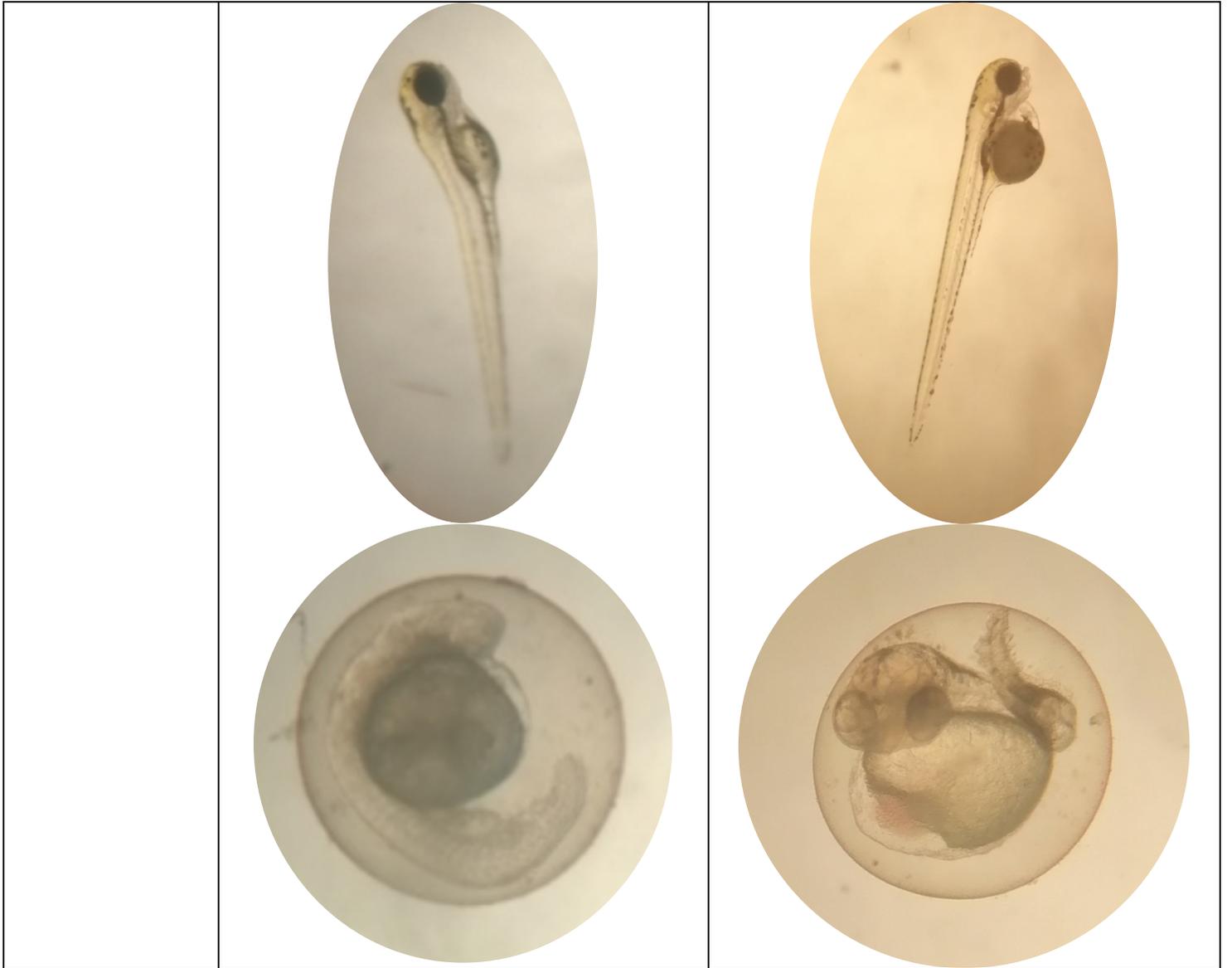
200



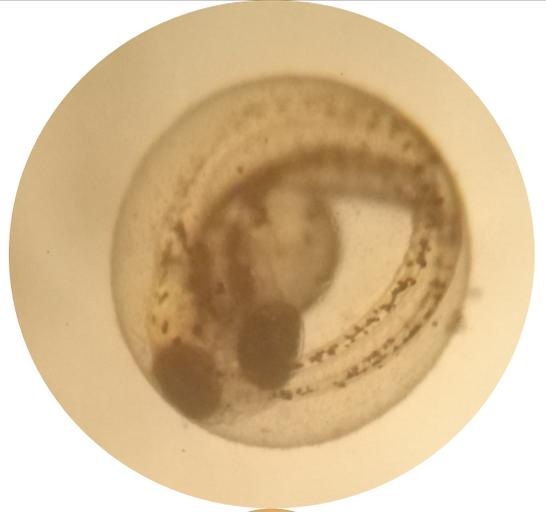
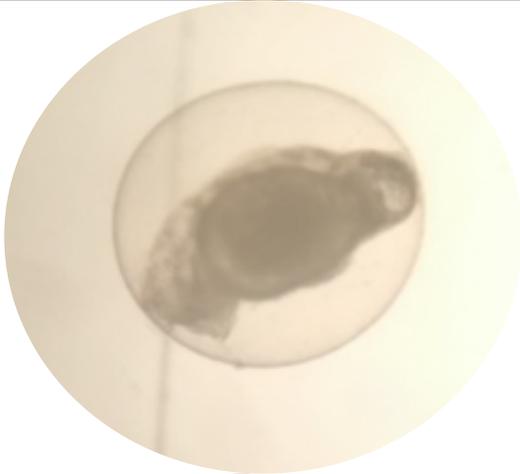
250



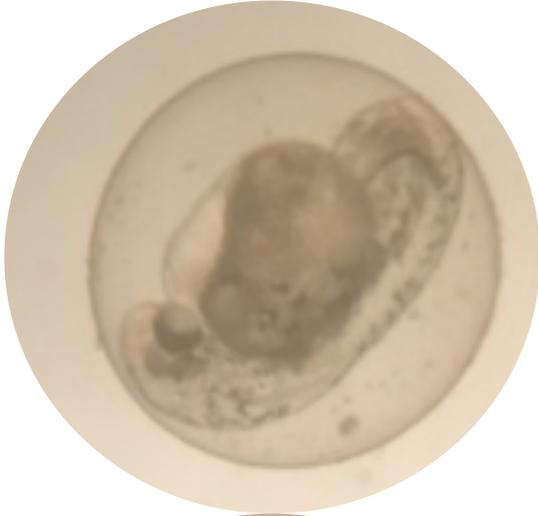
		
<b>300</b>		

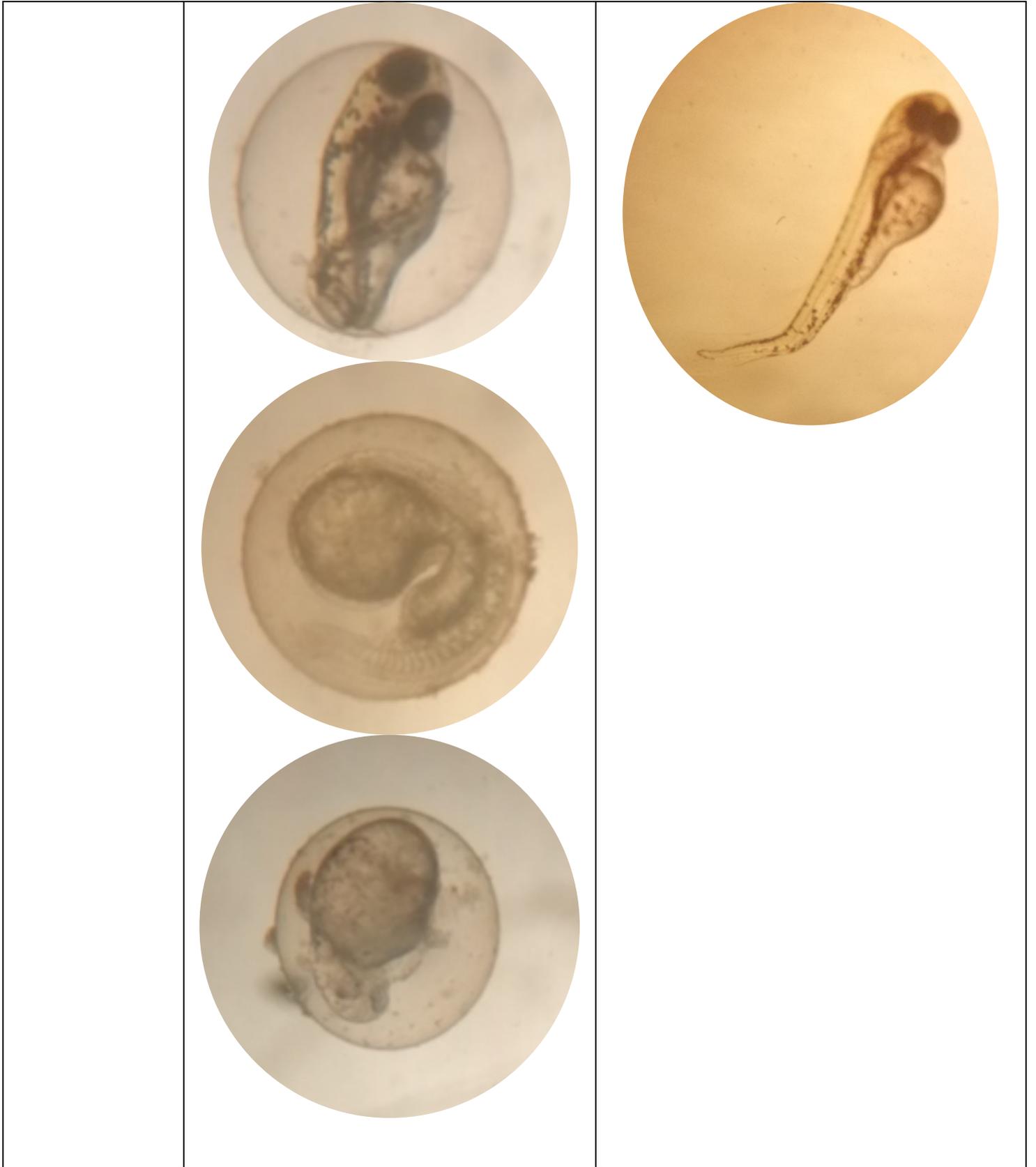


350

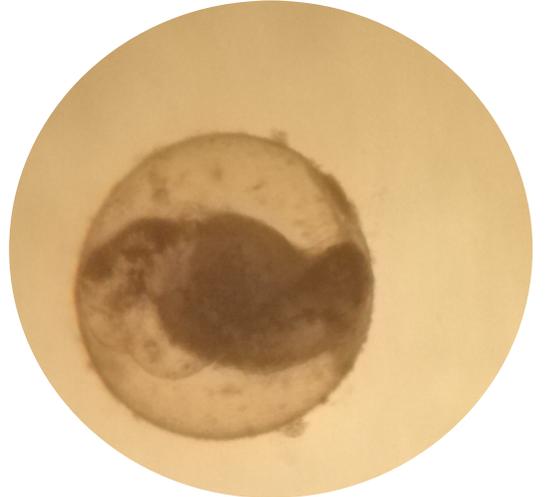
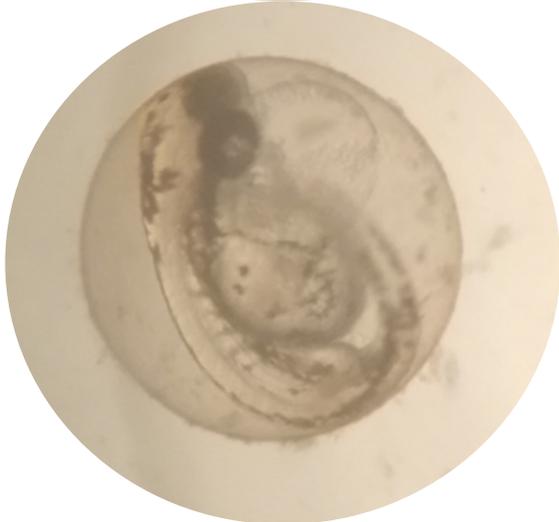
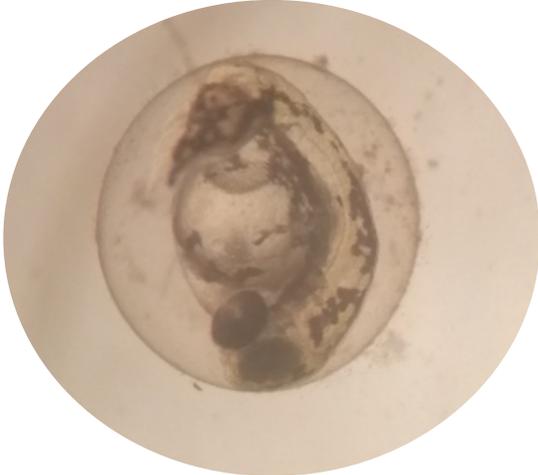


400

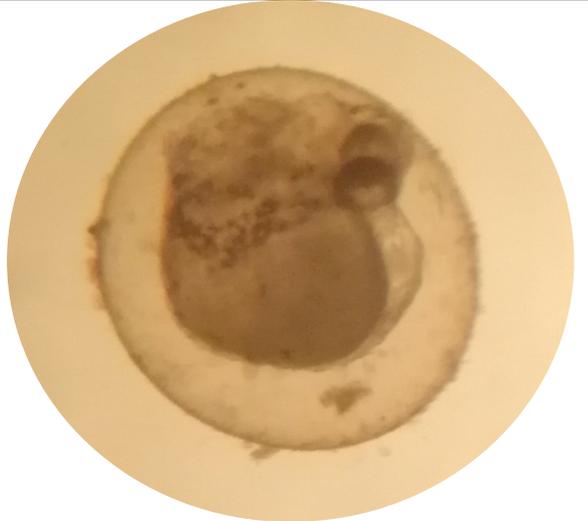
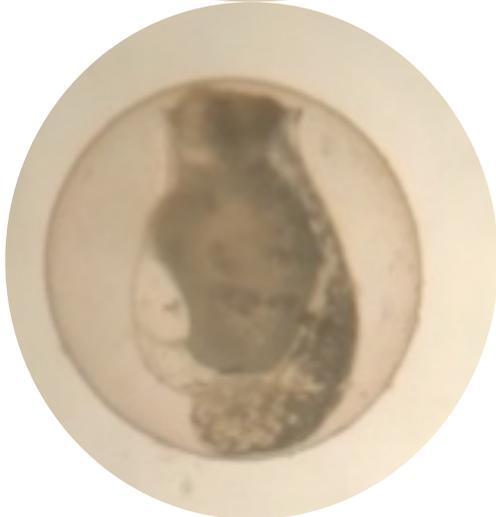
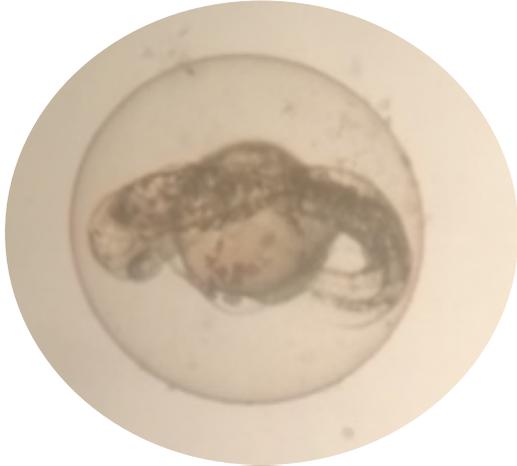




450



500



## Discusión

La relevancia de los resultados de este proyecto radica en que se mostró que concentraciones ambientalmente relevantes de TC (ng/L), son capaces de generar alteraciones en el desarrollo embrionario y efectos teratogénicos en embriones de *Danio rerio*.

En cuanto a estudios de embriotoxicidad y teratogenicidad, se tiene el de Escobar *et al.* en 2020, en este caso en *C. carpio*, donde reportaron una CL<sub>50</sub> y una CE<sub>50</sub> de 500.08 y 145.3 mg/L, respectivamente y un IT de 3.44, que resultan ser bastante más elevadas que las concentraciones a las que fueron expuestos los embriones durante este estudio. Es decir, se reportaron malformaciones en *Danio rerio* desde concentraciones inferiores que van en el orden de los ng/L, mientras que en *C. Carpio* se observan efectos en concentraciones que van en el orden de los mg/L. A pesar de que las concentraciones fueron muy distintas entre sí las malformaciones identificadas fueron muy similares, siendo las más recurrentes en ambos estudios las malformaciones en la cola, de corda, edema pericárdico, escoliosis y malformaciones del corazón.

En el estudio de Zhang *et al.* en 2015 la tetraciclina afectó el desarrollo de los embriones de manera dosis-dependiente, como en este estudio, sin embargo, ellos si reportaron un aumento significativo en la mortalidad a la concentración de 500 mg/L, aunque sus concentraciones fueron más elevadas (en el orden de los mg/L). Así mismo, la CL<sub>50</sub> que obtuvieron fue de 759.71 mg/L. Por otro lado, comenzaron a observar efectos desde los 10 µg/L con un aumento considerable en la actividad de caspasas. En el mismo estudio observaron retraso en el desarrollo, retraso en la eclosión, acortamiento del cuerpo, deformación de la cola y deformación del saco vitelino a 20 µg/L de TC. De acuerdo con este mismo estudio, Zhang, 2015, el desarrollo embrionario es especialmente sensible a las especies reactivas de oxígeno, contribuyendo a un desarrollo anormal de los organismos. Por otro lado, se sabe que la espirulina induce la actividad antioxidante, lo cual puede contribuir a disminuir los efectos adversos causados por formación de ROS, producto del metabolismo de fármacos por el sistema CYP450 (Abdelkhalek, 2015).

Así como los beneficios del alimento en los embriones se pueden observar en la disminución de la presencia de malformaciones, también pueden tener su origen en las gónadas de la madre, desde donde se puede presentar cierta actividad antioxidante y protectora por parte de los componentes del alga. Es el caso del estudio de Mills, en 2005, en el que se realizaron análisis morfológicos y determinación inmunohistoquímica de vitelogenina (Vtg) en ovarios de pez cebra, la Vtg al ser un precursor proteico del vitelo es clave para el éxito reproductivo de las hembras; en condiciones normales, las hembras maduras, producen estrógenos suficientes para inducir la vitelogénesis, pero la exposición a químicos puede provocar alteraciones (Mills, 2005); sin embargo, una buena alimentación, así como la presencia de antioxidantes en la dieta de las madres podrían disminuir los efectos adversos en los huevos una vez que éstos son expuestos a contaminantes.

En cuanto al enriquecimiento del alimento, se eligió el alga espirulina, porque se ha utilizado anteriormente como ingrediente en dietas complementarias para la cría de peces, camarones y pollos y se ha comercializado como suplemento proteico y vitamínico para especies acuícolas. Una de las características que la hacen de interés alimentario es que no contiene celulosa en su pared celular y contiene mureína (mucopolímero de fácil digestión por las enzimas digestivas del pescado) (Teimouri *et al.*, 2013). Además es un recurso alimenticio rico en vitaminas, aminoácidos esenciales, minerales, ácidos grasos esenciales (como el ácido linolénico) y pigmentos antioxidantes como los carotenoides y la ficocianina (Lafarga *et al.*, 2020).

Al contener enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, así como sistemas de defensa no enzimáticos (carotenoides, los tocoferoles, el ácido ascórbico y los derivados de la clorofila (Farag *et al.*, 2016) que ayudan a contrarrestar los efectos de las ROS, la espirulina tiene la capacidad de prevenir el daño celular (Abd El-Baky *et al.*, 2009; El-Tantawy, 2016; Kepekçi *et al.*, 2013).

Además, la dieta enriquecida con espirulina tiene como beneficio un aumento en la producción de ovocitos en un 220%, así como un aumento en los ovocitos fertilizados obtenidos en un 442%, en este estudio, estos datos concuerdan con los de Güroy et al., 2012, en cuyo estudio la tasa de producción de ovocitos en comparación con el grupo control aumentó de 101 a 346 ovocitos por hembra y aumentó la tasa de eclosión del 71.28% al 97.68%.

Sin embargo, se debe destacar que el efecto protector del alimento sobre la embriotoxicidad y teratogenicidad no se debe solo al enriquecimiento con espirulina, sino que la dieta también contiene otros componentes ayudan a contrarrestar la toxicidad del fármaco, como vitaminas (A, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12, D3 y E) y minerales (Ca, Cu, Mg), estas sustancias también actúan como captadores de las ROS en células y en las macromoléculas susceptibles a la oxidación. La dieta también contiene selenio que se ha asociado con actividad antioxidante y con el fortalecimiento del sistema inmunológico (Chu et al., 2010; Farag et al., 2016; Ramadan et al., 2008; Sahin et al., 2002) .

Aunado a lo anterior, en 2020, el estudio de Calabrò reportó que una alimentación con espirulina durante 40-60 días en hembras de *Danio rerio* propició un mayor número de ovocitos maduros en la gónada de las hembras adultas, esto en comparación con el grupo control, que no fue alimentado con espirulina: concluyendo que, efectivamente, los aditivos alimentarios pueden mejorar la fertilidad en los peces, e incluso podría estar relacionado con una mayor tasa de supervivencia de estos ovocitos una vez que son fecundados.

Una de las malformaciones que se encontró con mayor prevalencia fue el retraso en la eclosión o la no eclosión, la cual está definida como la incapacidad de los embriones para romper el corion (Osman, 2007). Así mismo, estas alteraciones en la eclosión inducirán la muerte de los embriones, ya que no podrán alimentarse una vez que agoten las reservas del saco vitelino. Esta incapacidad para eclosionar puede ser causada por diferentes factores, entre ellos se encuentran las malformaciones en la cola, debido a que, al no estar en la posición adecuada o con

la longitud necesaria, no tiene la fuerza para romper el corion y así poder eclosionar. Además, la enzima corionasa (responsable de la descomposición del corion) se inhibe ante la presencia de ROS o de daño oxidativo.

Las posibles causas de las malformaciones se describen a continuación. De acuerdo con estudios previos la exposición a concentraciones bajas y continuas de TC puede generar una inhibición de las enzimas involucradas en el desarrollo como CYP26, conduciendo a alteraciones en los procesos de migración, diferenciación y maduración de las células de la cresta neural. Y ya que estas células son las responsables de la formación de cartílago y hueso en el esqueleto de la cabeza y la formación del sistema esquelético en los peces lo anterior podría explicar las alteraciones como la ausencia de cabeza y de cola, así como las malformaciones en las mismas estructuras (Hermsen *et al.*, 2012; Menegola *et al.*, 2006; Staal *et al.*, 2018). También en el estudio de Zhang *et al.* en 2015 se observaron células apoptóticas en la cola, posible causa de las malformaciones de cola o de un acortamiento de ésta.

Por otra parte, la expresión del gen *df6* (factor de diferenciación del crecimiento 6) es fundamental para el desarrollo y buen funcionamiento del ojo de *D. rerio*, y anteriormente, en el estudio de Zhang en 2015, se reportó que la exposición a TC a concentraciones de 5, 10 y 20 µg/L en embriones de pez cebra inhibe dicho gen.

Otra de las malformaciones observadas fue malformación del saco vitelino, la cual podría generar un mantenimiento deficiente del gradiente osmótico en el embrión, resultando en una absorción excesiva de agua y por lo tanto en edema (Kimmel *et al.*, 1995), de esta manera se puede explicar la presencia de edema pericárdico también (Hollert *et al.*, 2003). El edema pericárdico es una malformación que compromete la integridad del embrión, debido a que la acumulación de líquido en el intersticio del pericardio aumenta el tamaño del corazón y su contracción cardíaca, lo que puede tener como consecuencia la muerte del organismo (Zodrow *et al.*, 2004).

Por otro lado, la hiperpigmentación del saco vitelino puede explicarse por la formación de ROS por exposición a TC, la presencia de estas especies favorece la alteración de la proteína scl24a5, generando la acumulación de calcio y alterando los canales de calcio transmembrana, afectando el proceso de melanogénesis, que se pueden observar como una acumulación de melanocitos y melanoblastos en el saco vitelino (Lamason *et al.*, 2005; Mugoni *et al.*, 2014). También estas especies prooxidantes tienen la capacidad de generar daño cardiovascular con el desarrollo de trombos y alteraciones en los niveles de fibrinógeno lo que favorece hemorragias (Han *et al.*, 2015).

El desarrollo embrionario fue evaluado de manera semicuantitativa con la escala de Hermesen, los efectos adversos que tuvo el aumento de la concentración del fármacos sobre las características a evaluar pueden estar relacionados con la capacidad de TC para alterar la señalización REDOX (Wang *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2015), ya que esta juega un papel fundamental en el proceso de embriogénesis. Debido a que en este período se producen modificaciones del potencial REDOX, las cuales conducen a las células hacia la proliferación o la diferenciación, muerte celular programada o necrosis, sin embargo las alteraciones en el estado oxidativo de la célula pueden modificar las etapas antes mencionadas (Dennerly, 2007; Hansen, 2006; Schieber *et al.*, 2014; Timme-Laragy *et al.*, 2018).

Además, la exposición a TC se ha asociado en estudios anteriores con daño al ADN, alteración del estado de las enzimas antioxidantes, alteraciones de la microbiota intestinal en varias especies de peces, entre ellos *Onchorynchus mykiss*, *Labeo rohita*, *Oreochromis niloticus* y *Danio rerio* (Almeida *et al.*, 2019; Ambili *et al.*, 2013; Limbu *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019). Este daño al material genético y las alteraciones, se han relacionado con el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y con la apoptosis celular. Por su parte el aumento en las ROS durante el desarrollo embrionario puede afectar al gen p53, el cual actúa como modulador y coordinador del ciclo celular (Li *et al.*, 2011). Además, el aumento de ROS se relaciona con alteraciones en la respuesta antioxidante innata lo cual

propicia condiciones prooxidantes en las células, favoreciendo la lipoperoxidación, daño al ADN, alteración de diferentes cascadas de señalización, disrupción en la expresión génica y alteración de proteínas (Gómez -Oliván et al., 2012).

Los resultados de este trabajo muestran que la presencia de TC en el medio representa un riesgo es para las especies acuáticas, y debido a que es un antibiótico ampliamente consumido que se encuentra presente en cuerpos de agua en concentraciones desde los ng/L hasta los µg/L se debe considerar de importancia y prioridad la necesidad de establecer un marco regulatorio para este tipo de sustancias.

## **Conclusiones**

La alimentación enriquecida de los progenitores redujo los efectos tóxicos inducidos por la exposición a tetraciclina sobre los embriones de *D. rerio*, al disminuir la frecuencia de malformaciones en los organismos.

Se encontró la prevalencia de 11 principales malformaciones presentes en ambos grupos expuestos a TC.

## Bibliografía

- Abbas, O. M.-H. (2020). The ability to use spirulina sp. as food for common carp fish (*Cyprinus carpio* L. 1758). *Plant Archives*, 20 (1), 532-535.
- Abd El-Baky, H. H., El Baz, F. K., & El-Baroty, G. S. (2009). Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(3), 623–631.
- Abdelkhalek, N. G.-D. (2015). Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22(4), 3023–3031.
- Alhaji, N. y. (2018). Antimicrobial usage by pastoralists in food animals in North- central Nigeria: the associated socio-cultural drivers for antimicrobials misuse and public health implications. *One Health*, 6, 41–47.
- Almeida, A. R., Tacão, M., Machado, A. L., Golovko, O., Zlabek, V., Domingues, I., & Henriques, I. (2019). Long-term effects of oxytetracycline exposure in zebrafish: A multi-level perspective. *Chemosphere*, 222, 333–344.
- Álvarez, C. (2011). Efectos teratogénicos del nitrato de plomo en el desarrollo embrionario del pez cebrá *Danio rerio* (Hamilton, 1822) a cinco dosis subletales (Tesis de licenciatura). (P. U. Javeriana, Ed.) Bogotá, Columbia : Pontificia Universidad Javeriana.
- Ambili, T. R., Saravanan, M., Ramesh, M., Abhijith, D. B., & Poopal, R. K. (2013). Toxicological effects of the antibiotic oxytetracycline to an Indian Major carp *Labeo rohita*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(3), 494–503.
- Ayala, N. (2014). Estudio comparativo de los efectos de los anestésicos metanosulfonato de tricafina (MS-222) y eugenol, para su uso en el pez cebrá (*Danio rerio*) como modelo experimental (Tesis doctoral). (U. d. Córdoba, Ed.) Córdoba, España: Universidad de Córdoba.
- Azanu, D. S. (2018). Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Sci. Total Environ.*, 622-623, 293–305.
- Bai, Y. R. (2019). Antibiotic resistome profile based on metagenomics in raw surface drinking water source and the influence of environmental factor: a case study in Huaihe River Basin, China. *Environ. Pollut.*, 248, 438–447.

- Bambino, K. y. (2017). Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Current Topics in Developmental Biology*, 124, 331-367.
- Bashahun, D. a. (2015). Assessment of antibiotic usage in intensive poultry farms in Wakiso District, Uganda. *Livest. Res. Rur. Dev*, 27.
- Batt, A. S. (2006). Occurrence of sulphonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. *Chemosphere*, 64, 1963–1971.
- Bisognin, R. W. (2019). Occurrence and fate of pharmaceuticals in effluent and sludge from a wastewater treatment plant in Brazil. *Environ. Technol.*, 1–12.
- Brooks, B. M. (2008). Antibiotics in Aquatic and Terrestrial Ecosystems. In Elsevier, *Ecotoxicology* (pp. 210-217). Amsterdam: Elsevier.
- Burke, V. R. (2016). Occurrence of antibiotics in surface and groundwater of a drinking water catchment area in Germany. *Water Environ. Res.*, 88, 652–659.
- Calabrò, C. B. (2020). Effects of spirulina diet on the oogenesis of zebrafish: morphological analysis and immunohistochemical determination of the vitellogenin. *Natural Product Research*, 1-6.
- Canadian Council on Animal Care. (2005). Guidelines on: The care and use of fish in research, teaching and testing. Canadá: Canadian Council on Animal Care.
- Canadian Council on Animal Care. (2007). Guidelines on: Procurement of animals used in science. Canadá: Canadian Council on Animal Care.
- Carvalho, I. S. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736-757.
- Chang, P. J.-Y. (2015). Antibiotic tetracycline in the environments — A review. *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(3), 15-40.
- Chen, F. Y. (2017). Hierarchical assembly of graphene-bridged Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Ag/BiVO<sub>4</sub> (040) Z-scheme photocatalyst: An efficient, sustainable and heterogeneous catalyst with enhanced visible-light photoactivity towards tetracycline degradation under visible light irradiation. *Appl. Catal. B-Environ.*, 200, 330–342.
- Chen, L. L. (2018). Presence of antibiotics in shallow groundwater in the northern and southwestern regions of China. *Ground Water*, 56, 451–457.
- Chen, Y. C.-H. (2018). Occurrence, Distribution, and Risk Assessment of Antibiotics in a Subtropical River-Reservoir System. *Water*, 10(2).

- Choi, K. K. (2008). Removal of antibiotics by coagulation and granular activated carbon filtration. *J. Hazard Mater*, 151, 38–43.
- Chu, W. L., Lim, Y. W., Radhakrishnan, A. K., & Lim, P. E. (2010). Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 53.
- Craig, J. (2006). Ethical justification for the use and treatment of fishes in research. *Journal of Fish Biology*, 68, 1-2.
- Daghrir, R. y. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 11, 209–227.
- Deng, W. L. (2018). Antibiotic distribution, risk assessment, and microbial diversity in river water and sediment in Hong Kong. *Environ. Geochem. Health*, 40, 2191–2203.
- Dennerly, P. A. (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 81(3), 155–162.
- Díaz, L. y. (2013). Evaluación del estrés oxidativo inducido por el efluente proveniente de una industria farmacéutica en branquias de *Cyprinus carpio* (Tesis de licenciatura). Estado de México, México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- Ding, H. W. (2017). Occurrence, distribution, and risk assessment of antibiotics in the surface water of Poyang Lake, the largest freshwater lake in China. *Chemosphere*, 184, 137–147.
- Dong, L. X. (2011). The DNA damage and joint effects of two typical veterinary drugs on the earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Sci. Circumstantiae*, 31, 2798–2803.
- El-Tantawy, W. H. (2016). Antioxidant effects of *Spirulina* supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(4), 327–331.
- Elizalde, A. G.-J. (2017). Ecotoxicological studies of pharmaceuticals in aquatic organisms. In *Ecopharmacovigilance*. México: Springer.
- Escobar, F. G. (2020). Embryotoxic and teratogenic profile of tetracycline at environmentally relevant concentrations on *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*, 240.
- Farag, M. R., Alagawany, M., El-Hack, M. E. A., & Dhama, K. (2016). Nutritional and healthical aspects of *Spirulina (Arthrospira)* for poultry, animals and human. *International Journal of Pharmacology*. Asian Network for Scientific Information.

- Farombi, E. U. (2008). Tetracycline-induced reproductive toxicity in male rats: effects of vitamin C and N- acetylcysteine. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 60, 77–85.
- Gamse J. y Gorelick, D. (2016). Mixtures, Metabolites, and Mechanisms: Understanding Toxicology Using Zebrafish. *Zebrafish*, 377-378.
- Gao, L. S. (2012). 2012. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Haihe River in China. *J. Environ. Monit.*, 14, 1247–1254.
- Goldstone, J. J. (2009). Cytochrome P450 1D1: A novel CYP1A-related gene that is not transcriptionally activated by PCB126 or TCDD. *Arch. Biochem. Biophys.*, 482, 7–16.
- Gómez-Oliván, L. M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., ... Corral-Avitia, A. Y. (2012). Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyalella azteca*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(8), 5097–5104.
- Guerra, P. K. (2014). Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Science of The Total Environment*, 473(474), 235–243.
- Güroy, B., Şahin, I., Mantoğlu, S., & Kayali, S. (2012). Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. *Aquaculture International*, 20(5), 869–878.
- Halling-Sorensen, B. (2000). Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*, 40, 731–739.
- Han, Y., Zhang, J., Qian, J., & Hu, C. (2015). Cardiotoxicity evaluation of anthracyclines in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Applied Toxicology*, 35(3), 241–252.
- Han, C. P. (2020). Oxidation of tetracycline and oxytetracycline for the photo-Fenton process: their transformation products and toxicity assessment. *Water Res.*, 172.
- Hansen, J. M. (2006). Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 78(4), 293–307
- Hermesen, S. A. B., Pronk, T. E., van den Brandhof, E. J., van der Ven, L. T. M., & Piersma, A. H. (2012). Triazole-induced gene expression changes in the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology*, 34(2), 216–224.

- Hermesen, S. B. (2011). Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicology in Vitro*, 25, 745–753.
- Hollert, H., Keiter, S., König, N., Rudolf, M., Ulrich, M., & Braunbeck, T. (2003). A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils and Sediments*, 3(3), 197–207.
- Hou, J. W. (2015). The occurrence and fate of tetracyclines in two pharmaceutical wastewater treatment plants of Northern China. *Environ Sci Pollut Res*, 23, 1722–1731.
- Hou, J. W. (2016). The occurrence and fate of tetracyclines in two pharmaceutical wastewater treatment plants of Northern China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23, 1722–1731.
- Isidori, M. L. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment*, 346, 87–98.
- Jafari Ozumchelouei, E. H. (2020). Physicochemical properties of antibiotics: a review with an emphasis on detection in the aquatic environment. *Water Environ. Res.*, 92, 177–188.
- Javid, A. M. (2016). Assessment of tetracycline contamination in surface and groundwater resources proximal to animal farming houses in Tehran, Iran. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 14(4), 1-5.
- Jjemba, P. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotox Environ Safe*, 63, 113–130.
- Kafaei, R. P. (2018). Occurrence, distribution, and potential sources of antibiotics pollution in the water-sediment of the northern coastline of the Persian Gulf, Iran. *Sci. Total Environ.*, 627, 703–712.
- Kang H., K. H. (2005). Several human pharmaceutical residues in aquatic environment may result in endocrine disruption in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Korean J Environ Health*, 31, 227–233.
- Kanwal Rehman, S. H. (2020). Toxicity of antibiotics. In M. Z. Hashmi (Ed.), *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment* (pp. 234-252). Oxford: Elsevier.

- Kepekçi, R. A., Polat, S., Çelik, A., Bayat, N., & Saygideger, S. D. (2013). Protective effect of *Spirulina platensis* enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by CCl<sub>4</sub>. *Food Chemistry*, 141(3), 1972–1979.
- Kim, H. L. (2012). The individual and population effects of tetracycline on *Daphnia magna* in multigenerational exposure. *Ecotoxicology*, 21, 993–1002.
- Kim, P. (2007). Chlortetracycline caused vitellogenin induction at male Japanese medaka (*Oryzias Latipes*). *Korean J environ Health*, 33, 513–516.
- Kim, Y. L. (2016). Effect of runoff discharge on the environmental levels of 13 veterinary antibiotics: a case study of Han River and Kyungahn Stream, South Korea. *Mar. Pollut. Bull.*, 107, 347–354.
- Kimmel, C. B. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203, 253-310.
- Kivits, T. B. (2018). Presence and fate of veterinary antibiotics in agedated groundwater in areas with intensive livestock farming. *Environ. Pollut.*, 241, 988–998.
- Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J. M., González-López, C., & Ación-Fernández, F. G. (2020). *Spirulina* for the food and functional food industries. *Food Research International*. Elsevier Ltd.
- Lamason, R. L., Mohideen, M. A. P. K., Mest, J. R., Wong, A. C., Norton, H. L., Aros, M. C., ... Cheng, K. C. (2005). Genetics: SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science*, 310(5755), 1782–1786.
- León, M. (2015). Caracterización físico-química, biológica y ecotoxicológica del agua residual de un hospital de la ciudad de Cuenca (Tesis de maestría). Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Lesnik, U. L. (2015). Construction of a New Class of Tetracycline Lead Structures with Potent Antibacterial Activity through Biosynthetic Engineering. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(13).
- Li, G., Chen, J., Xie, P., Jiang, Y., Wu, L., & Zhang, X. (2011). Protein expression profiling in the zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to the microcystin-LR. *PROTEOMICS*, 11(10), 2003–2018.
- Li, N. H. (2017). Veterinary antibiotics in food, drinking water, and the urine of preschool children in Hong Kong. *Environ. Int.*, 108, 246–252.

- Li, S. S. (2018). A duodecennial national synthesis of antibiotics in China's major rivers and seas (2005-2016). *Sci. Total Environ.*, 615, 906–917.
- Li, W. S. (2012). Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere*, 89, 1307–1315.
- Li, X. W. (2019). Combination of ozonation and electrolysis process to enhance elimination of thirty structurally diverse pharmaceuticals in aqueous solution. *J. Hazard. Mater.*, 368, 281–291.
- Li, Y. F. (2018). Distribution characteristics and ecological risk assessment of tetracyclines pollution in the Weihe River, China. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15, 1803–1814.
- Limbu, S. M., Zhou, L., Sun, S. X., Zhang, M. L., & Du, Z. Y. (2018). Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk. *Environment International*, 115, 205–219.
- Lin, Y. X. (2013). Fast and highly efficient tetracyclines removal from environmental waters by graphene oxide functionalized magnetic particles. *Chem. Eng. J.*, 225, 679–685.
- Liu, H. Y. (2018). Fate of tetracycline in enhanced biological nutrient removal process. *Chemosphere*, 193, 998–1003.
- Liu, L. W. (2018). Progress of research on the toxicology of antibiotic pollution in aquatic organisms. *Acta Ecologica Sinica*, 38, 36–41.
- Liu, X. Z. (2019). Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China. *Environ. Pollut.*, 246, 163–173.
- Longyao Xu, H. Z. (2021). Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment*, 753, 1-17.
- Lu, J. Z. (2019). Occurrence and spatial distribution of antibiotic resistance genes in the Bohai Sea and Yellow Sea areas, China. *Environ. Pollut.*, 252, 450–460.
- Lu, L. L. (2018). Occurrence and distribution of tetracycline antibiotics and resistance genes in longshore sediments of the Three Gorges Reservoir, China. *Front. Microbiol.*, 9.

- Lu, L. L. (2020). Antibiotic resistance gene abundances associated with heavy metals and antibiotics in the sediments of Changshou Lake in the three gorges reservoir area, China. *Ecol. Indic.*, 113.
- Luja, M. G. (2019). Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes. *Science of the Total Environment*, 660, 751-764.
- Lundstrom, S. O.-P. (2016). Minimal selective concentrations of tetracycline in complex aquatic bacterial biofilms. *Sci. Total Environ.*, 553, 587–595.
- Marcovich, M. R. (2007). Diet Affects Spawning in Zebrafish. *Zebrafish*, 4(1), 69-74.
- Menegola, E., Broccia, M. L., Di Renzo, F., & Giavini, E. (2006). Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. *Reproductive Toxicology*, 22(2), 186–195.
- Miao, X. B. (2004). Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ Sci Technol.*, 38, 3533–3541.
- Mills, L. y. (2005). Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment*, 343, 1-34.
- Miranda, M. C.-F. (1998). Antioxidant activity of the microalgae *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31, 1075-1079.
- Mugoni, V., Camporeale, A., & Santoro, M. M. (2014). Analysis of oxidative stress in Zebrafish embryos. *Journal of Visualized Experiments*, (89).
- National Center for Biotechnology Information. (2020). Tetracycline. Retrieved mayo 2020, from PubChem Database: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetracycline>
- Nkoom, M. L. (2018). Occurrence and ecological risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in Taihu Lake, China: a review. *Environ Sci Process Impacts*, 20, 1640–1648.
- OECD, O. f.-o. (2013). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 236 - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD.

- Oldenkamp, R. B. (2019). Aquatic risks from human pharmaceuticals—modelling temporal trends of carbamazepine and ciprofloxacin at the global scale. *Environ. Res. Lett.*, 14, 1-11.
- Osman, A. W. (2007). Lead induced malformations in embryos of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Environ. Toxicol.*, 22(7), 375–389.
- Peña, M. (2008). Evaluación del efecto de la temperatura en la teratogenicidad del mercurio en embriones del pez cebra, método DarTa (Tesis de licenciatura). Pachuca, Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Peng, Q. S. (2019). Biogeochemical characteristics and ecological risk assessment of pharmaceutically active compounds (PhACs) in the surface seawaters of Jiaozhou Bay, North China. *Environ. Pollut.*, 255.
- Pereira, A. S. (2015). Fluoroquinolones and tetracycline antibiotics in a Portuguese aquaculture system and aquatic surroundings: occurrence and environmental impact. *J. Toxicol. Environ. Health, A* 78, 959–975.
- Qiu, W. L. (2020). Single and joint toxic effects of four antibiotics on some metabolic pathways of zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Sci. Total Environ.*, 716.
- Quintero, A. (2017). Evaluación ecotoxicológica de la carbamazepina y los nonilfenoles en agua (Tesis de maestría). Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ramadan, M. F., Asker, M. M. S., & Ibrahim, Z. K. (2008). Functional bioactive compounds and biological activities of spirulina platensis lipids. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(3), 211–222.
- Rivera, I. (2006). Determinación de la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, operculo y aleta en *Danio rerio* Hamilton, 1822, como posibles biomarcadores en la valoración de daño teratogénico (Tesis de licenciatura). Pachuca, Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Rodrigues, S., Antunes, S. C., Correia, A. T., & Nunes, B. (2018). Oxytetracycline effects in specific biochemical pathways of detoxification, neurotransmission and energy production in *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 100–108.

- Rooklidge, S. (2004). Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways. *Sci Total Environ*, 325, 1-13.
- Saad, M. C. (2016). Xenobiotic metabolism in the zebrafish: a review of the spatiotemporal distribution, modulation and activity of Cytochrome P450 families 1 to 3. *The Journal of Toxicological Sciences*, 41 (1), 1-11.
- Sahin, K., Kucuk, O., Sahin, N., & Sari, M. (2002). Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation status, serum hormone, metabolite, and mineral concentrations of Japanese quails reared under heat stress (34°C). *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 72(2), 91–100.
- SanJuan-Reyes, N. G.-O.-F.-M.-M.-G.-N. (2017). Occurrence of Pharmaceuticals in the Environment. En L. Gómez-Oliván, *Ecopharmacovigilance: Multidisciplinary Approaches to Environmental Safety of Medicines* (págs. 43-56). Ciudad de México: Springer International Publishing.
- Santos, L. y. (2016). Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 16-30.
- Schieber, M. a. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.*, 24, R453–R462.
- Selvam, A. K. (2016). Influence of livestock activities on residue antibiotic levels of rivers in Hong Kong. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24, 9058–9066.
- Sengupta, A. S. (2016). Tetracycline uptake and metabolism by vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides* L. Nash). *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23, 24880–24889.
- Shimizu, A. T. (2013). Ubiquitous occurrence of sulfonamides in tropical Asian waters. *Science of The Total Environment*, 452–453.
- Solis, S. (2013). Alteraciones en el desarrollo embrionario del pez cebrá por exposición a muestras del Río Atoyac y descargas industriales (Tesis de licenciatura). Ciudad de México, México: Universidad Autónoma de México.
- South African Bureau of Standards. (2008). The care and use of animals for scientific purposes. South African National Standard, SABS Standards Division. Sudáfrica: South African Bureau of Standards.

- Staal, Y. C. M., Meijer, J., van der Kris, R. J. C., de Bruijn, A. C., Boersma, A. Y., Gremmer, E. R., ... van der Ven, L. T. M. (2018). Head skeleton malformations in zebrafish (*Danio rerio*) to assess adverse effects of mixtures of compounds. *Archives of Toxicology*, 92(12), 3549.
- Sun, C. L. (2019). Responses of antibiotics, antibiotic resistance genes, and mobile genetic elements in sewage sludge to thermal hydrolysis pre-treatment and various anaerobic digestion conditions. *Environ. Int.*, 133.
- Tang, J. W. (2019). Predicting distribution coefficients for antibiotics in a river water–sediment using quantitative models based on their spatiotemporal variations. *Sci. Total Environ.*, 655, 1301–1310.
- Teimouri, M., Amirkolaie, A. K., & Yeganeh, S. (2013). The effects of spirulina platensis meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 396–399, 14–19.
- Tejada, C. Q. (2014). Contaminantes emergentes en aguas: metabolitos de fármacos: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 80-101.
- Timme-Laragy, A. R., Hahn, M. E., Hansen, J. M., Rastogi, A., & Roy, M. A. (2018, August 1). Redox stress and signaling during vertebrate embryonic development: Regulation and responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd.
- Tolls, J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ Sci Technol*, 35, 3397–406.
- Topal, M. T. (2016). Investigation of tetracycline and degradation products in Euphrates River receiving outflows of trout farms. *Aquac. Res.*, 47, 3837–3844.
- Tran, N. C. (2016). Occurrence and removal of multiple classes of antibiotics and antimicrobial agents in biological wastewater treatment processes. *Water Res.*, 104, 461–472.
- Tran, N. H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research*. Pergamon, 133, 182–207.
- Tran, N. H. (2019). Occurrence and risk assessment of multiple classes of antibiotics in urban canals and lakes in Hanoi, Vietnam. *Sci. Total Environ.*, 692, 157–174.

- Van Boeckel, T. B. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112, 5649–5654.
- Wang, M., Chen, X., Zhang, R., Zhao, J., Yang, C., & Wu, L. (2020). Developmental toxicity and transcriptome analysis of 4-epianhydrotetracycline to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science of the Total Environment*, 734, 139227.
- Wang, Z. C. (2019). Characterization and source identification of tetracycline antibiotics in the T drinking water sources of the lower Yangtze River. *Journal of Environmental Management*, 244, 13-22.
- Wang, Z. D. (2017). Occurrence and ecological hazard assessment of selected antibiotics in the surface waters in and around Lake Honghu, China. *Sci. Total Environ.*, 609, 1423–1432.
- Wei, C. L. (2019). Direct photo transformation of tetracycline and sulfanamide group antibiotics in surface water: kinetics, toxicity and site modeling. *Sci. Total Environ.*, 686, 1-9.
- Wilson, C. B. (2004). Structural and functional responses of plankton to a mixture of four tetracyclines in aquatic microcosms. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 6430–6439.
- Wixon, J. (2000). Featured Organism: *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast*, 17, 225-231.
- Xie, X. Z. (2010). Xie X, Zhou Q, He Z, Bao Y (2010) Physiological and potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ Toxicol Chem*, 29, 922–928.
- Xie, H. H. (2019). Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds in the Pearl River Delta: occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment. *Sci. Total Environ.*, 659, 230–239.
- Xu, D. X. (2019). Toxic effects of tetracycline and its degradation products on freshwater T green algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 43–47.
- Xu, L. Z. (2021). Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment.*, 753, 1-17.
- Xu, Y. G. (2016). Occurrence and distribution of antibiotics, antibiotic resistance genes in the urban rivers in Beijing, China. *Environ. Pollut*, 213, 833–840.

- Yang, C., Song, G., & Lim, W. (2020, November 1). A review of the toxicity in fish exposed to antibiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*. Elsevier Inc.
- Yang, W. T. (2013). Toxicity studies of tetracycline on *Microcystis aeruginosa* and *Selenastrum capricornutum*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 35, 320–324.
- Yang, W. T. (2013). Toxicity studies of tetracycline on *Microcystis aeruginosa* and *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Toxicol. Phar.*, 35, 320–324.
- Yao, L. W. (2017). Occurrence and risk assessment of antibiotics in surface water and groundwater from different depths of aquifers: a case study at Jiangnan Plain, central China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 135, 236–242.
- Ye, J. D. (2017). Toxin release of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* after exposure to typical tetracycline antibiotic contaminants. *Toxins*, 9.
- Yin, H. K. (2006). Hepatic gene expression profiling and lipid homeostasis in mice exposed to steatogenic drug, tetracycline. *Toxicol. Sci.*, 94, 206–216.
- Yu, X., Wu, Y., Deng, M., Liu, Y., Wang, S., He, X., ... Tu, W. (2019). Tetracycline antibiotics as PI3K inhibitors in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative stress in zebrafish larvae. *Chemosphere*, 226, 696–703.
- Zhang, Q. C. (2015). Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology*, 24(4), 707-719.
- Zhang, R. P. (2018). Occurrence and distribution of antibiotics in mariculture farms, estuaries and the coast of the Beibu Gulf, China: bioconcentration and diet safety of seafood. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 154, 27–35.
- Zhao, S. L. (2016). Temporal–spatial variation and partitioning prediction of antibiotics in surface water and sediments from the intertidal zones of the Yellow River Delta. China. *Sci. Total Environ.*, 569, 1350–1358.
- Zhu, X. W. (2013). Photocatalytic degradation of tetracycline in aqueous solution by nanosized TiO<sub>2</sub>. *Chemosphere*, 92, 925–932.
- Zodrow, J. M., Stegeman, J. J., & Tanguay, R. L. (2004). Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 66(1), 25–38.

## Anexo 1: Evidencia de envío del artículo de investigación

**Environmental Toxicology and Pharmacology**  
**Protective effect of a diet enriched with spirulina (*Arthrospira maxima*) against alterations to the embryonic development and teratogenic effect of tetracycline in *Danio rerio***  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Keywords:</b>	Danio rerio; spirulina diet; commercial diet; embryotoxicity; teratogenicity
<b>Corresponding Author:</b>	Leobardo Manuel Manuel Gómez Oliván, PhD Universidad Autónoma del Estado de México Toluca, MEXICO
<b>First Author:</b>	Paulina Tenorio-Chávez
<b>Order of Authors:</b>	Paulina Tenorio-Chávez Leobardo Manuel Manuel Gómez Oliván, PhD María Dolores Hernández-Navarro José Manuel Orozco-Hernández Ricardo Pérez-Pastén Borja Hariz Islas-Flores Marcela Galar-Martínez
<b>Abstract:</b>	The present study investigated the protective effect of a spirulina enriched diet on embryotoxicity and teratogenicity induced by tetracycline (TC) in zebrafish embryos. OECD 236 test was used to evaluate survival, embryonic development and teratogenic effects induced by TC (50-500 ng L <sup>-1</sup> ) on <i>D. rerio</i> embryos. Toxicity tests were performed on embryos from parents fed for six months on: 1) commercial diet and 2) spirulina enriched diet. The results revealed that embryos from parents fed with spirulina diet showed lower percentages of mortality and malformations compared to those from parents fed with commercial diet. The main teratogenic effects by TC were chorda and craniofacial malformations and hatching retardation. These results allow us to conclude that the spirulina diet has an improving influence on embryotoxicity and teratogenicity induced by TC, thus, the spirulina enriched feed formulated may be a valuable candidate for functional feed in aquaculture
<b>Suggested Reviewers:</b>	Chang-Qin Hu huoq@nifdc.org.cn Ming Hung Wong minghwong@eduhk.hk Kaouthar Kessabi kaoutharkessabi@yahoo.fr
<b>Opposed Reviewers:</b>	

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58

**Protective effect of a diet enriched with spirulina (*Arthrospira maxima*) against alterations to the embryonic development and teratogenic effect of tetracycline in *Danio rerio***

Paulina Tenorio-Chávez<sup>1</sup>, Leobardo Manuel Gómez-Oliván<sup>1\*</sup>, María Dolores Hernández-Navarro<sup>1</sup>, José Manuel Orozco-Hernández<sup>1</sup>, Ricardo Pérez-Pastén Borja<sup>2\*</sup> Hariz Islas-Flores<sup>1</sup>, Marcela Galar-Martínez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan, Colonia Residencial Colón, CP 50120, Toluca, Estado de México, México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Toxicología Molecular, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu s/n y cerrada Manuel Stampa, Col. Industrial Vallejo, Ciudad de México, CP, 07700, México.

<sup>3</sup> Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu s/n y cerrada Manuel Stampa, Col. Industrial Vallejo, Ciudad de México, CP, 07700, México.

\*Corresponding authors:

Dr. Leobardo Manuel Gómez-Oliván

E-mail: lmgomezo@uaemex.mx; lgolivan74@gmail.com

Dr. Ricardo Pérez-Pastén Borja

E-mail: pastenrich@yahoo.com.mx