



Universidad Autónoma del Estado de México

Embriotoxicidad y Teratogenicidad inducida por fluconazol  
sobre *Danio rerio*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestría en Ciencia y Tecnología Farmacéutica

PRESENTA:

Tesis de maestría

**Francisco Escobar Huerfano**

ASESORES:

**Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván**

**Dra. Hariz Islas Flores**

**Dra. María Dolores Hernández Navarro**

## Índice General

Abreviaturas .....	4
Índice de Figuras .....	6
Índice de tablas.....	7
Resumen.....	8
Abstract .....	9
1. Introducción .....	10
2. Antecedentes .....	12
2.1. Agua .....	12
2.2. Contaminación .....	13
2.2.1 Contaminación del agua .....	14
2.2.2 Contaminantes emergentes.....	14
2.2.3. Tipos de contaminantes emergentes.....	16
2.2.4. Legislación de los contaminantes emergentes.....	16
2.3. Fuentes de contaminación a cuerpos acuáticos .....	18
2.3.1. Contaminación acuática por fármacos .....	20
2.3.2. Fármacos .....	23
2.3.3. Antimicóticos .....	23
2.3.3.1. Demanda económica global de antimicóticos .....	26
2.3.4. Azoles.....	26
2.3.4.1. Actividad antimicótica .....	27
2.3.4.2. Mecanismo de acción de los azoles.....	27
2.3.5. Fluconazol .....	28
2.3.5.1. Ficha técnica de fluconazol .....	29
2.3.5.1. Farmacodinamia de fluconazol .....	30
2.3.5.2. Farmacocinética de fluconazol.....	31
2.3.5.3. Interacción con otros fármacos.....	31
2.3.5.4. Fuentes y destino de fluconazol en el medio ambiente. ....	32
2.3.5.6. Estudios toxicológicos.....	34
2.4. Bioensayos .....	35
2.4.1. Bioindicador .....	35
2.4.2. Ensayos toxicológicos y su normatividad .....	36
2.5. Biomarcadores.....	37

2.6.	<i>Danio Rerio</i> .....	38
2.7.	Embriotoxicidad y teratogenicidad .....	39
2.8.	Estrés oxidativo .....	39
2.8.1.	Radicales libres .....	40
2.8.2.	Especies Reactivas de oxígeno (ERO) .....	41
2.9.	Expresión génica .....	42
3.	Planteamiento del problema .....	43
4.	Pregunta de investigación.....	43
5.	Hipótesis.....	44
6.	Objetivo general .....	44
6.1.	Objetivos específicos.....	44
	• Evaluar el estrés oxidativo inducido por FCZ en ovocitos de <i>Danio rerio</i> .....	44
	• Evaluar los efectos involucrados en expresión génica en ovocitos de <i>Danio rerio</i> expuestos a FCZ. ....	44
7.	Materiales y métodos .....	44
7.1.	Mantenimiento de los progenitores .....	44
7.2.	Producción de ovocitos y fertilización .....	45
7.3.	Exposición.....	46
7.3.1.	Evaluación del perfil de embriotoxicidad. ....	46
7.3.2.	Cálculo de LC50, EC50s e índice teratogénico (TI) para fluconazol.....	47
7.3.3.	Evaluación del perfil embriotóxico y teratogénico para fluconazol.....	47
7.4.	Determinación del estrés oxidativo .....	47
7.5.	Análisis integrado de respuesta de biomarcadores.....	48
7.6.	qRT-PCR.....	48
7.7.	Cuantificación de FCZ en agua .....	49
7.8.	Prueba de validez y análisis estadístico.....	50
8.	Resultados y discusión .....	50
8.1.	Puntuación de Hermesen.....	50
8.2.	Tasa de embriones muertos y malformados .....	51
8.3.	Principales malformaciones inducidas por FCZ.....	52
8.4.	Tasa de eclosión .....	55
8.5.	Estrés oxidativo .....	56
8.6.	IBR .....	58

8.7. qRT-PCR.....	62
Determinación de FCZ en muestras de agua.....	64
9. Conclusiones .....	68
10. Referencias.....	68
11. Anexos.....	84

## Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADN <sub>c</sub>	Acido desoxirribonucleico complemetario
ARN	Acido ribonucleico
ARN <sub>m</sub>	Acido ribonucleico mensajero
UNESCO	United NAtions Educational, Scientific and Cultural Organization (Organización de las Naciones Unidas)
SEMARNAT	Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales
WWAP	World Water Assessment Programme (Programa mundial de evaluacion de los recursos hidricos)
CAGR	compound annual growth rate (tasa de crecimiento anual compuesta)
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SIDA	Sindrome de Inmunodeficiencia Adquirida
LCR	Liquido Cefalorraquideo
FDA	Food and Drug Administration (Administracion de Alimentos y Medicamentos)
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección al Ambiente)
SOD	Super Oxido Dismutasa
ROS	(Reactive Oxide Species) Especies Reactivas de Oxigeno
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
Vd	Volumen de distribucion
CAT	Catalasa
GPx	Peroxidasa
POX	Carbonilación de proteínas
LPX	Lipoperoxidación
HPC	contenido de hidroperóxido
FCZ	Fluconazol
CL	Concentracion Letal
CE	Concentracion Efectiva
hpf	horas post-fertilizacion
hrs	Horas
g	gramos

µg	microgramos
ng	nanogramos
Kg	kilogramos
L	litros
cm	centimetro
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)
RL	Radicales libres
CONAGUA	Comision Nacional del Agua
OECD	Organización para la Economía Cooperación y desarrollo
FET	Fish Embriotoxicology Test (Prueba embriotoxicologica en pez
ANOVA	Analysis of Variance (Análisis de Varianza)
FT	Factores de transcripción
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
IBR	Integrated Biomarker Response (Respuesta de Biomarcadores Integrados)
qRT-PCR	Quantitive Real Time-Polymerasa Chain Reaction
(HPLC)	High Performance Liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
RE	Retraso en la Eclosión
EP	Edema Pericárdico
MC	Malformación de la Cola
E	Escoliosis
MS	Malformación del Saco
RD	Retraso en el Desarrollo
ARE	(Antioxidant Response Element) Elemento de respuesta antioxidante
GCLC	Glutamate Cysteine Ligase Catalytic Subunit (Subunidad Catalítica de Glutamato Cisteína Ligasa)
AR	Retinoic acid (ácido retinoico)

## Índice de Figuras

Figura	Nombre	Página
--------	--------	--------

1	Uso del agua en actividades antropogénicas	13
2	Los contaminantes emergentes más importantes	16
3	Fuentes y rutas potenciales de los contaminantes emergentes en el medio acuático	19
4	Evolución cronológica de los antimicóticos	24
5	Clasificación de los antimicóticos por su estructura química	25
6	Mecanismo de acción de acción	28
7	Estructura química de bis-triazol y fluconazol	29
8	<i>Danio rerio</i>	34
9	Puntuación de Hermesen de embriones expuestos a FCZ	51
10	Porcentaje de embriones muertos, teratogénicos y sanos expuestos a FCZ	52
11	Prevalencia de malformaciones en embriones expuestos a FCZ	54
12	Principales malformaciones encontradas en embriones expuestos a FCZ	55
13	Tasa de eclosión de embriones expuestos a FCZ	56
14	Biomarcadores de estrés oxidativo evaluados en peces expuestos a FCZ	58
15	IBR y gráficos de estrellas de biomarcadores de estrés oxidativo	61
16	Expresión génica de NRF1, NRF2, CYP26A1, CYP26B1, WNT3A, WNT8A, NRD1 y NRD2 en larvas de <i>D. rerio</i> expuestas a FCZ.	63
17		
18		

## Índice de tablas

Tabla	Nombre	Página
1	Normas relacionadas con el tratamiento de aguas residuales en México	17
2	Países con presencia de compuestos farmacéuticos como contaminantes en muestras acuáticas	21
3	Imidazoles y Triazoles más usados en Estados Unidos	26
4	Efecto producido por azoles frente a algunas micosis	27
5	Ficha técnica de FCZ	29
6	Estudios de ocurrencia de FCZ	32
7	Estudios toxicológicos en animales con FCZ	34
8	Métodos utilizados para evaluar biomarcadores de estrés oxidativo en los embriones	48
9	Genes usados para qRT-PCR	49
10	Concentraciones medidas de FCZ en el agua de la prueba de embriotoxicidad y el experimento de estrés oxidativo	64

## Resumen

En los últimos años los casos de enfermedades ocasionadas por hongos han ido en incremento; para el tratamiento de estos padecimientos se empezaron a utilizar antimicóticos con actividad antifúngica que mediante diferentes mecanismos de acción ocasionando el crecimiento o incluso la muerte de hongos. El primer medicamento utilizado anfotericina B en la década de los 50 y a partir de la década de los 80 se descubren los azoles. El fluconazol es un antimicótico del grupo azol usado de primera línea para el tratamiento de enfermedades por micosis no filamentosos. Este fármaco no cuenta con una regulación en su uso ya que no necesita receta médica y es de fácil acceso lo que ocasiona que se obtenga de manera sencilla ocasionando un uso irresponsable teniendo como consecuencia la presencia de este antifúngico en diferentes matrices acuáticas.

En un inicio se creía que la presencia de este fármaco en diferentes matrices acuáticas no ocasionaba efectos nocivos en el ambiente, pero recientes estudios han ido demostrando lo contrario a tal punto que en la década pasada fue incorporado al grupo de contaminantes emergentes poniéndolo en la mira para ser candidato a una futura regulación. Aunque haya pocos estudios que reportan la toxicidad de este fármaco, existen evidencias científicas de que puede afectar al sistema endocrino en organismos acuáticos y afectar el desarrollo en plantas, sin dejar a un lado el problema de los diferentes mecanismos que han ido desarrollando los microorganismos que permite ser más resistente ante la presencia no solo de antimicóticos sino de una variedad de fármacos. El presente estudio tiene como objetivo evaluar las alteraciones al desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos inducidos por fluconazol (FCZ) a concentraciones ambientalmente relevantes sobre embriones de *Danio rerio* a 12, 24, 48, 72 y 96 hpf. En cada uno de los tiempos se pretende identificar y cuantificar las malformaciones que se presenten durante del desarrollo de los organismos expuestos a fluconazol, además se calculará el índice teratogénico para determinar si el compuesto es teratogénico o embrioletal para la vida de esta especie en los cuerpos de agua.

Además de realizar un estudio que permita refutar que este antimicótico puede generar efectos tóxicos entre los que destaca daño al ADN (ácido desoxirribonucleico), alteraciones al desarrollo embrionario y estrés oxidativo en *Danio rerio*.

## Abstract

In recent years the cases of diseases caused by fungi have been increasing; For the treatment of these conditions, antimycotics with antifungal activity began to be used, which through different mechanisms of action causing the growth or even death of fungi. The first drug used amphotericin B in the 1950s and from the 1980s the azoles were discovered. Fluconazole is an azole group antifungal used first line for the treatment of non-filamentous mycoses. This drug does not have a regulation in its use since it does not need a prescription and it is easily accessible, which means that it is obtained in a simple way, causing irresponsible use, resulting in the presence of this antifungal in different aquatic matrices.

Initially, it was believed that the presence of this drug in different aquatic matrices did not cause harmful effects on the environment, but recent studies have shown the opposite to such an extent that in the past decade it was incorporated into the group of emerging contaminants, putting it in the spotlight. to be a candidate for a future regulation. Although there are few studies that report the toxicity of this drug, there is scientific evidence that it can affect the endocrine system in aquatic organisms and affect development in plants, without leaving aside the problem of the different mechanisms that the microorganisms that have been developing have been developing. It allows to be more resistant in the presence not only of antimycotics but also of a variety of drugs. The objective of this study is to evaluate the alterations to embryonic development and the teratogenic effects induced by fluconazole (FCZ) at environmentally relevant concentrations on *Danio rerio* embryos at 12, 24, 48, 72 and 96 hpf. In each of the times it is intended to identify and quantify the malformations that occur during the development of the organisms exposed to fluconazole, in addition the teratogenic index will be calculated to determine if the compound is teratogenic or embryolethal for the life of this species in the bodies. of water.

In addition to carrying out a study to refute that this antimycotic can generate toxic effects, among which DNA damage, alterations to embryonic development and oxidative stress in *Danio rerio* stand out.

## 1. Introducción

De toda la variedad de productos farmacéuticos, los antimicóticos son uno de los grupos más empleados, debido a que estos tienen un amplio uso, que va desde el tratamiento de enfermedades en humanos y animales para hacerle frente a algunas plagas ocasionadas por micosis en área agrícola (Liu *et al.*, 2018; Carvalho., 2016). Estudios han reportado que los antimicóticos más usados son anfotericina B y los azoles, siendo los segundos que se dividen en dos grupos: Imidazoles y Triazoles (Goodman & Gilman., 2007). La estructura de los azoles es muy parecida y consiste en la composición de un anillo heterocíclico aromático de una estructura similar al 1,3-ciclopentadieno, pero en el que algunos de los átomos de carbono son sustituidos por átomos de nitrógeno u otro elemento distinto del carbono, esta estructura le permite inhibir el citocromo P450 de las células fúngicas, ocasionando una alteración en el empacamiento de las cadenas acilo de fosfolípidos y, con ello, alteran las funciones de algunos sistemas enzimáticos de la membrana, como trifosfatasa de adenosina y enzimas del sistema del transporte electrónico y de esta manera inhibir la proliferación de los hongos (Flores *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2012; Westlund & Yargeau., 2017; De Assis *et al.*, 2018). En el grupo de los azoles, se encuentra fluconazol, antimicótico de primera línea usada para el tratamiento de enfermedades por micosis, en Estados Unidos ocupó el puesto número 133 con más prescripciones llegando a 5 millones de estas. Fluconazol ha mostrado ser efectivo contra: *C. immitis*, *C. neoformans* y *P. brasiliensis*. Coccidioidomicosis y hongos no filamentosos y carece de actividad frente a *Aspergillus Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.* y *Penicillium spp.* (Goodman & Gilman., 2007; Mediavilla *et al.*, 2008; Assress *et al.*, (2019)).

El amplio uso médico y veterinario FCZ permite que este compuesto llegue a los cuerpos de agua, a través de descargas municipales, hospitalarias e industriales. Esto puede ser demostrado en los diversos reportes que hay en la literatura acerca de su ocurrencia, por ejemplo, Kahle *et al.*, (2008) reportó una concentración de 10 y 100 ng L<sup>-1</sup> de FCZ en muestras de aguas residuales de la depuradora municipal ubicada en Zúrich y superficies de varios lagos en la región de Swiss Midland., Suiza respectivamente. Huang *et al.*, (2013) en agua del Rio Perla encontraron una variedad de fármacos antimicóticos, siendo la concentración de FCZ más alta 109.6 ng L<sup>-1</sup>. En España se reportaron concentraciones en muestras de efluentes con un rango de 20-93 ng L<sup>-1</sup> y en influentes de 37-95 ng L<sup>-1</sup> (Casado *et al.*, 2014). Assress *et al.*, (2019) recolectaron muestras de aguas residuales de una planta de tratamiento de aguas

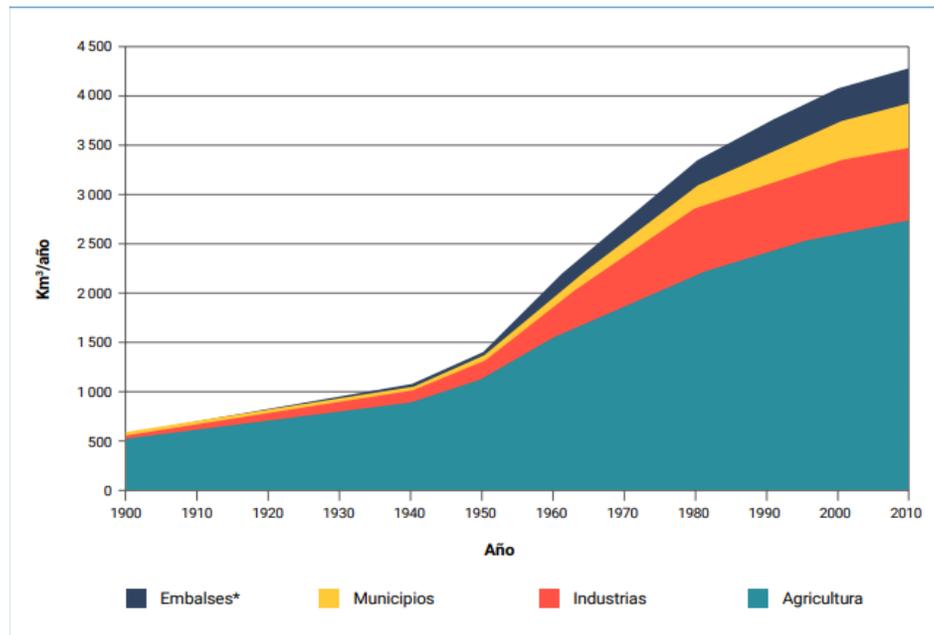
residuales en Pretoria, Sudáfrica, donde se encontraron concentraciones de FCZ de 302.38 ng L<sup>-1</sup>. No solo existen estudios de ocurrencia, sino que también se han realizado estudios toxicológicos en organismos para determinar qué efectos tiene FCZ en organismos acuáticos, por ejemplo, que en el organismo *Pseudokirchneriella subcapitata* se reportó que fluconazol puede ocasionar inhibición de crecimiento del organismo a concentraciones de 10 y 15 µM (Chen *et al.*, 2014), en otro trabajo, se determinó que la CE<sub>50</sub> de fluconazol en *Daphnia magna* correspondía a 2 766.423 ng L<sup>-1</sup>, utilizando como bioindicador la inmovilización del organismo (Chen & Ying; 2015)

La generación de estrés oxidativo inducido por FCZ ya ha sido demostrada en algunos estudios, Zhu *et al.*, (2014) demostraron que 0,2 mg L<sup>-1</sup> de FCZ aumentaron significativamente los niveles enzimáticos de SOD y glutatión s-transferasa en embriones de *Gobiocypris rarus*. Además, varios otros estudios han indicado que FCZ indujo ROS en diferentes hongos (Peng *et al.*, 2018; Marotta & Tiboni., 2010)

## 2. Antecedentes

### 2.1. Agua

Se sabe que la importancia del agua es infinita, ya que de ahí se originó la vida como la conocemos hoy en día y dada a sus propiedades fisicoquímicas únicas no existe sustituto en la actualidad y se desconoce alguna forma de vida que no dependa de ella (SOBRESOPIO., 2019). Además, el agua tiene un papel importante para la realización de varias actividades antropogénicas (Figura 1), según en el Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2021 (UNESCO., 2021) en la actualidad, la agricultura ocupa el 69% del agua extraída a nivel mundial, siendo el riego la actividad más agua usa, seguidas de la ganadería y acuicultura. La industria es la segunda actividad (incluyendo la energía y generación de energía) con un 19%, mientras que los municipios son responsables del 12% restante (UNESCO., 2021).



**Figura 1:** Uso del agua en diferentes actividades antropogénicas en el mundo en los últimos 100 años. Fuente UNESCO., 2021

En México, el uso del agua se distribuye de la siguiente manera, la agricultura usa el 76.3 % de toda el agua que se extrae de acuíferos, ríos y lagos, comparado con un 9.1 % por parte de la industria y un 14.6 % que es utilizado para uso de los municipios según la SEMARNAT., (2015).

En la actualidad la calidad del agua se ha visto severamente afectada debido a la presencia de productos químicos o biológicos ajenos de estos reservorios de agua (Díaz & Gómez., 2013).

## 2.2. Contaminación

De acuerdo con la SEMARNAT., (2015), la contaminación se define como la presencia de energía o materia cuya naturaleza, ubicación o cantidad produce efectos negativos en el ambiente. Otro término aceptado es que es un cambio inducido por el ser humano a la integridad ambiental, ya sea física, biológica o química, mediante la introducción directa o indirecta de agentes ajenos al mismo, lo cual ocasiona efectos nocivos en los ecosistemas,

así como es la salud ambiental y también pública, ya que dificulta la provisión de recursos de buena calidad para el bienestar de éstos (Quintero., 2017).

### 2.2.1 Contaminación del agua

Los niveles de contaminación en cuerpos acuáticos han tenido un incremento alarmante debido a las actividades antropogénicas representando un problema ambiental para el mundo (Alloway & Ayres, 1993). Como se mencionó anteriormente, la contaminación es la adición de cualquier sustancia al agua en cantidad suficiente para producir daño alguno a la flora y fauna, debido a causas naturales o actividades antropogénicas (SAGAN., 2007).

La contaminación del agua es la introducción de materia o de determinadas condiciones sobre el agua, de manera directa o indirecta, teniendo como consecuencia la alteración de la calidad de ésta, en relación con sus usos posteriores y a sus servicios ambientales (Díaz & Gómez., 2013). La contaminación del agua se puede producir por varios factores, entre ellas tenemos a los microorganismos patógenos, desechos orgánicos, sustancias químicas inorgánicas, nutrientes vegetales inorgánicos, compuestos orgánicos, sedimentos y materiales suspendidos, sustancias radiactivas.

Se estima que el 80% de las aguas residuales industriales son lanzadas a los cuerpos de agua sin ningún tipo de tratamiento para su purificación provocando un deterioro en la calidad de agua (UNESCO., 2017).

En los últimos años, el incremento demográfico sumado a las actividades del ser humano ha dado origen a una gran variedad de contaminantes que afectan la calidad del agua y a los organismos que dependen de esta (Díaz & Gómez., 2013).

### 2.2.2 Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes son compuestos de los cuales se sabe poco o nada sobre su presencia e impacto en los diferentes compartimentos ambientales, razón por la cual y a su vez consecuencia de que no hayan sido regulados, y de que la disponibilidad actual de

métodos para su análisis sea nula o limitada. Otra particularidad de estos compuestos es que, debido a su elevada producción y consumo, y a la continua introducción de estos en el ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos (Damiá & López de Alda., 2018).

Debido a que los contaminantes emergentes se encuentran en concentraciones bajas se creía que eran inocuos, pero estudios recientes han evidenciado que dichos contaminantes presentan efectos significativos sobre los organismos acuáticos, alterando al sistema endocrino y bloqueando o perturbando las funciones hormonales, ya sea que actúen de manera individual, en combinación con otros compuestos o bien, por sus metabolitos, los cuales suelen ser compuestos mucho más tóxicos (García *et al.*, 2012; Gil *et al.*, 2012).

Otras características de estos contaminantes es que no están regulados y pueden ser candidatos para la regulación futura dependiendo de la investigación sobre sus potenciales efectos al ambiente y a la salud y datos de monitoreo con respecto a su ocurrencia (Hernández *et al.*, 2019). Otra característica de estos contaminantes es que debido a su creciente producción y consumo se van acumulando más en el ambiente (Ortega & Ramírez., 2017).

Los contaminantes emergentes tienen diferentes fuentes de origen, como lo son: aguas residuales de tipo doméstico e industrial, residuos de las plantas de tratamiento, efluentes hospitalarios y tanques sépticos, otra formas en que estos contaminantes pueden llegar a cuerpos acuáticos es a través de la lixiviación y la escorrentía de las explotaciones ganaderas y/o acuícolas, también a través de la utilización de estiércol y purines a las tierras agrícolas llegando como aguas residuales a plantas de tratamiento (OCDE, 2012).

En dichas aguas residuales se encuentran un gran número de componentes, algunos de los cuales, las plantas de tratamiento convencionales no están diseñadas para eliminar, y se han encontrado en diferentes concentraciones en las aguas superficiales, cuyos efectos ambientales han sido determinados, sin embargo, el perfil toxicológico se debe de ampliar (Gil *et al.*, 2012).

### 2.2.3. Tipos de contaminantes emergentes

Existen diferentes tipos de contaminantes emergentes (Figura 2), en el 2016 se identificaron cerca de 700 tipos de contaminantes emergentes y metabolitos en cuerpos acuáticos en Europa, los más comunes son: los plaguicidas, productos de cuidado personal (desodorantes, jabones, dentífricos), aditivos industriales, los productos perfluorados, nanopartículas, microplásticos y de tipo farmacéutico (Gil *et al.*, 2012; Norman., 2016).



**Figura 2:** Los contaminantes emergentes más importantes

### 2.2.4. Legislación de los contaminantes emergentes

LA situación actual relacionada a la regulación de contaminantes emergentes ha ido en incremento en los últimos años, más y más compuestos han sido regulados, pero por el otro lado aún quedan otros que no han sido regulados, debido a la brecha entre estos datos y el marco regulatorio de estas sustancias. Una posibilidad es que se deba a la escasez de información que cuantifique los riesgos que conlleva una exposición a mediano y largo de estos contaminantes, ya sea de manera individual y/o sus metabolitos en los ecosistemas (Santos *et al.*, 2010).

La situación en el mundo con respecto a la regulación de estos contaminantes en diferente, en Estados Unidos la Agencia de Protección al Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés), publica año con año la lista de los contaminantes emergentes que serán candidatos a alguna futura normalización (USEPA., 2011). Por otro lado, la FDA es la encargada de regular en

ese mismo país todo lo relacionado a compuestos farmacéuticos, incluyendo los antimicóticos (Santos *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2012).

En México, cerca del 70% de los cuerpos de agua presentan algún tipo de contaminación, según varias investigaciones, se han hallado la presencia de diferentes contaminantes emergentes, como productos de uso cotidiano, orgánicos e incluso de tipo fármaco, siendo los últimos hallados en aguas residuales en la ciudad de Morelia, Michoacán (Robledo-Zacarías *et al.*, 2016; CONAGUA., 2017).

Aunque exista un bajo registro sobre la presencia de mezclas complejas de contaminantes emergentes no regulados en aguas residuales mexicanas (Robledo-Zacarías *et al.*, 2016), uno de los problemas más grandes que enfrente México es que no cuenta con una normatividad específica para el tratamiento de dichos contaminantes, y las pocas normas (tabla 1) que existen no están actualizadas para frente a este problema en la actualidad, ya que los sistemas de tratamiento de aguas residuales que operan no fueron diseñados para depurar sólidos, materia orgánica disuelta y nutrientes, por lo que varios productos o compuestos tóxicos pasan el proceso de tratamiento con poca o nula modificación en su concentración (SEMARNAT., 1996; Robledo-Zacarías *et al.*, 2016).

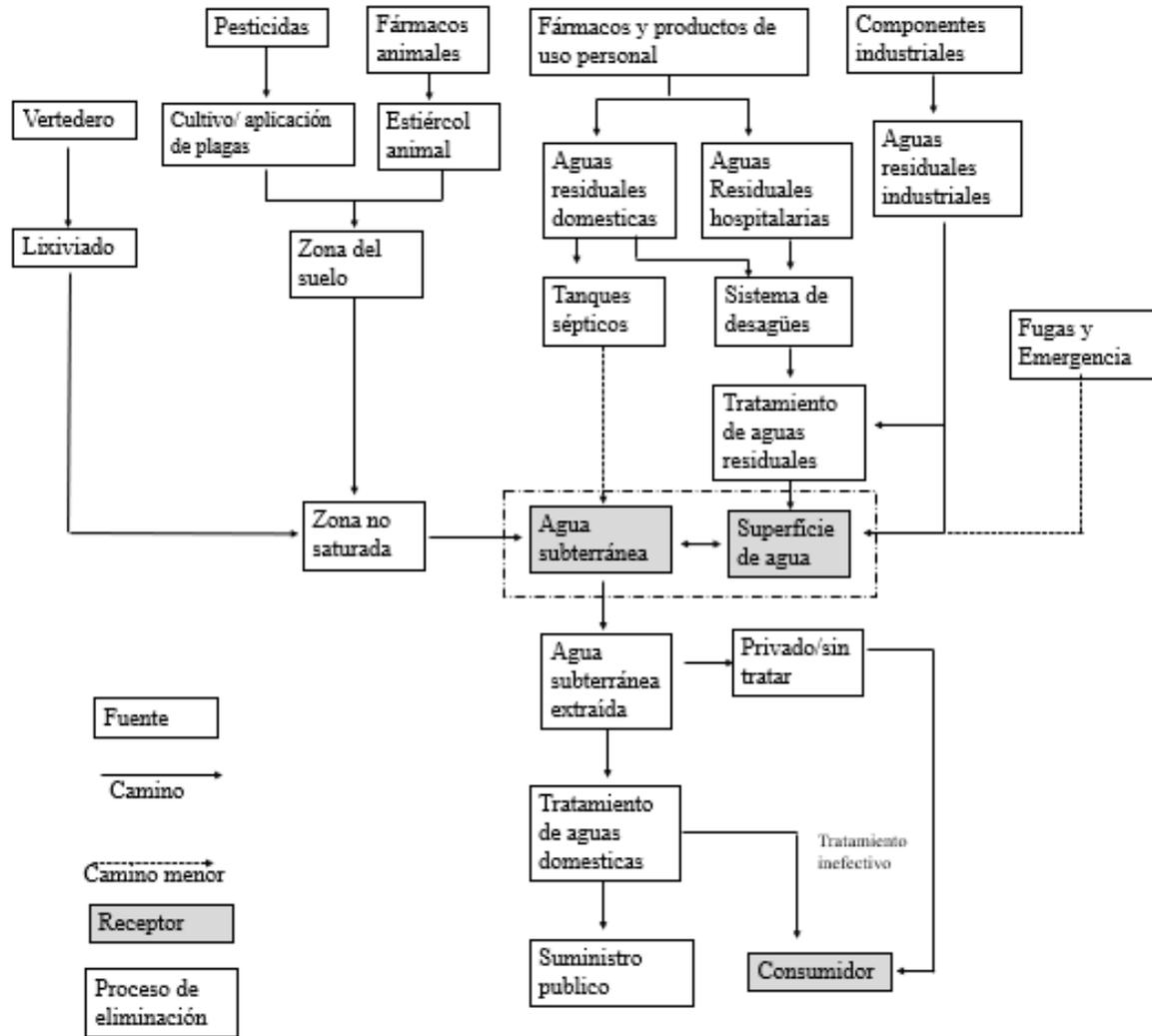
**Tabla 1:** Normas relacionadas con el tratamiento de aguas residuales en México (Información obtenida de: <https://www.semarnat.gob.mx/gobmx/biblioteca/nmx.html>)

<b>Norma</b>	<b>Descripción</b>	<b>Año de entrada en vigor</b>
NOM-001-SEMARNAT-1996	Límites Máximos permisibles de contaminantes en descargas de aguas residuales y bienes nacionales	06 de enero de 1997
NOM-002-SEMARNAT-1996	Límites máximos permisibles de contaminantes en descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado municipal o urbano	03 de junio de 1998

NOM-003-SEMARNAT-1997	Límites máximos permisibles de contaminantes de aguas residuales que sean reusables para uso publico	21 de septiembre de 1998
NOM-014-CONAGUA-2003	Establecer los requisitos que deben cumplir: la calidad del agua, la operación y el monitoreo utilizados en los sistemas de recarga artificial de acuíferos con agua residual tratada.	18 de agosto del 2009
NOM-179-SSA1-1998	Establecer los requisitos y especificaciones que deberán observarse en las actividades de control de la calidad del agua para uso y consumo humano	24 de septiembre de 2001

### 2.3. Fuentes de contaminación a cuerpos acuáticos

Se ha descubierto que tanto las aguas superficiales como las subterráneas contienen contaminantes emergentes. Algunos investigadores han descubierto que la presencia de algunos productos de uso cotidiano y productos farmacéuticos en las aguas superficiales. La variabilidad se debe a factores como la frecuencia de uso y las dosis en diferentes regiones, y la efectividad de las plantas de tratamiento (Munthe *et al.*, 2017). Además, el tipo de fuente influye en el grado de exposición y en las propiedades de la sustancia (Stefanakis *et al.*, 2015). La Figura 3 muestra las fuentes y las posibles rutas de los contaminantes emergentes liberados a la atmósfera y disueltos en varios receptores.



**Figura 3:** Fuentes y rutas potenciales de los contaminantes emergentes en el medio acuático (traducido) (Arman *et al.*, 2021)

También en otras investigaciones científicas se ha mostrado que los efluentes e influentes es una de las principales vías de entrada de los productos farmacéuticos en el ambiente acuático (Luja-Mondragón *et al.*, 2019). Dichas vías de entrada están influenciadas por dos factores: 1) el mecanismo de entrada, 2) por las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes (Sanganyado & Kajau., 2022).

También tenemos que existen dos tipos de contaminación acuática:

- Contaminación de fuente puntual: los contaminantes emergentes tienen un punto único de descarga, por lo que los efluentes industriales, municipales, acuícolas y de operaciones concentradas de alimentación animal entrarían son algunos ejemplos descarga directa de contaminantes emergentes en los sistemas acuáticos (Sanganyado & Kajau., 2022).
- Contaminación de fuente difusa o no puntual: que es lo opuesto, ya que ocurre cuando los contaminantes ingresan al medio ambiente a través de fuentes difusas. Algunos ejemplos de contaminación de fuentes no puntuales incluyen la escorrentía agrícola, la deposición aérea, las filtraciones, los lixiviados de vertederos y las emisiones de vehículos (Sanganyado & Kajau., 2022).

La contaminación de fuentes puntuales es más fácil de monitorear y regular en comparación con la contaminación de fuentes difusas (Malkoske *et al.*, 2016). Comprender el transporte de contaminantes en los sistemas acuáticos es esencial para el desarrollo de estrategias efectivas de mitigación y monitoreo de la contaminación acuática.

Otro tipo de vías por la que los contaminantes emergentes (ligeros y volátiles obtenidos por la combustión la deposición los gases de combustión industriales y la fumigación con plaguicidas) pueden llegar a cuerpos acuáticos. La deposición atmosférica está involucrada con el movimiento de contaminantes emergentes de la atmósfera directamente a los ambientes acuáticos. Un flujo de contaminantes en la atmósfera puede ser vía deposición seca o húmeda (Sanganyado & Kajau., 2022).

Una deposición húmeda implica la deposición de partículas o partículas disueltas en un penacho aéreo después de la precipitación. Por el contrario, la deposición seca ocurre cuando las partículas de la pluma aérea se asientan en ambientes acuáticos debido a la gravedad (Sanganyado & Kajau., 2022).

### 2.3.1. Contaminación acuática por fármacos

En los últimos años la preocupación por la contaminación ocasionada por productos de tipo farmacéutico ha ido en aumento. Las vías principales de productos farmacéuticos en el medio ambiente son a través de la excreción humana, la eliminación de los productos no utilizados (de manera irresponsable) y por el uso agrícola y ganadero (Gil *et al.*, 2012). Una amplia gama de productos farmacéuticos (véase Tabla 2) se ha detectado en aguas superficiales y subterráneas de varios países en el mundo.

**Tabla 2:** Países con presencia de compuestos farmacéuticos como contaminantes en muestras acuáticas

<b>País</b>	<b>Compuesto farmacéutico</b>	<b>Concentración (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Japón</b>	Acemetacina	5	(Simazaki., 2015)
	Acetaminoféno	2.8	
	Antipirina	8.3	
	Aspirina	6	
	Diclofenaco	2.5	
	Diflunisal	2	
<b>Malasia</b>	propiconazol	17,6–4493,1	(Elfikrie <i>et al.</i> , 2020)
	pimetrozina	1.3–260.8	
	Imidacloprid	4,6–57,7	
	Tebuconazol	4,0–512,1	
<b>Francia</b>	Carbamazepina	41,6	Galindo-Miranda <i>et al.</i> , 2019)
	Oxazepam	57	
	paracetamol	71	
	Atenolol	34	
	Roxitromicina	18.1	
	Ácido salicílico	29,0	
<b>Estados Unidos</b>	Sulfametoxazol	113	(Schaidler <i>et al.</i> , 2018)
	Fenitoína	66	
<b>Canadá</b>	Carbamazepina	601	(Kleywegt <i>et al.</i> , 2012)
	Eritromicina	155	

	Lincomicina	1413	
	Roxitromicina	41	
<b>China</b>	Acetaminofén	15.2	(Lin <i>et al.</i> , 2016)
	Antipirina	3.8	
	Carbamazepina	0,8	
<b>España</b>	Benzotriazol	16	(Esteban <i>et al.</i> , 2014)
	Morfina	27.2	(Jurado <i>et al.</i> , 2017)
<b>Bangladesh</b>	Clindamicina	35.7	(Ángeles <i>et al.</i> , 2019)
	Lincomicina	115.3	
	Metronidazol	276.9–332.1	
<b>México</b>	Ibuprofeno		(Cruz-Esteban <i>et al.</i> , 2014)
	Naproxeno		
	Ketoprofeno		
	Tetraciclina		
	Ampicilina	3 100	(Navarro <i>et al.</i> , 2014)
	Clonazepam	75 840	
	Lormetazepam	11 680	
	Secobarbital		
	Paracetamol		
	Lidocaína		
Entre otros			

Hay varios factores que están involucrados en la manera en que un contaminante farmacéutico llega a cuerpos acuáticos, como sus propiedades fisicoquímicas de los mismos, los componentes del suelo, entre otros, y dichos estos factores pueden intervenir en como estos compuestos puede llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o acumularse en el suelo pudiendo afectar de manera negativa al ecosistema y a los humanos u organismos que dependen del agua a través de la cadena trófica (Gil *et al.*, 2012).

Cabe mencionar que los productos farmacéuticos son un grupo diverso de compuestos que son ubicuos en los sistemas acuáticos. Estos se consideran pseudopersistentes y porque, a pesar de que tienen vidas medias cortas (días a meses) en matrices acuáticas, los productos farmacéuticos se descargan de manera continua en el medio ambiente, lo que los vuelve persistentes (Sanganyado *et al.*, 2017). A pesar de que sean contaminantes puntuales, es decir, sean monitoreados y regulados, aun no se han logrado erradicar completamente en plantas de tratamientos.

### 2.3.2. Fármacos

Como ya se citó en el apartado anterior, los contaminantes emergentes de tipo fármaco son de especie de interés debido a que este grupo de compuestos fueron diseñados para tener actividades intrínsecas per se. Estos productos farmacéuticos representan un riesgo ambiental debido a su amplio uso hospitalario, veterinario, agrícola e industrial y a sus productos de transformación en el ambiente, lo que provoca toxicidad en los componentes vivos de los ecosistemas (Jiménez., 2011).

Existen una gran variedad de fármacos con diferentes funciones: antibióticos, analgésicos, antidepresivos, relajantes musculares, antivirales, antimicóticos, entre otros (Flores *et al.*, 2008)

### 2.3.3. Antimicóticos

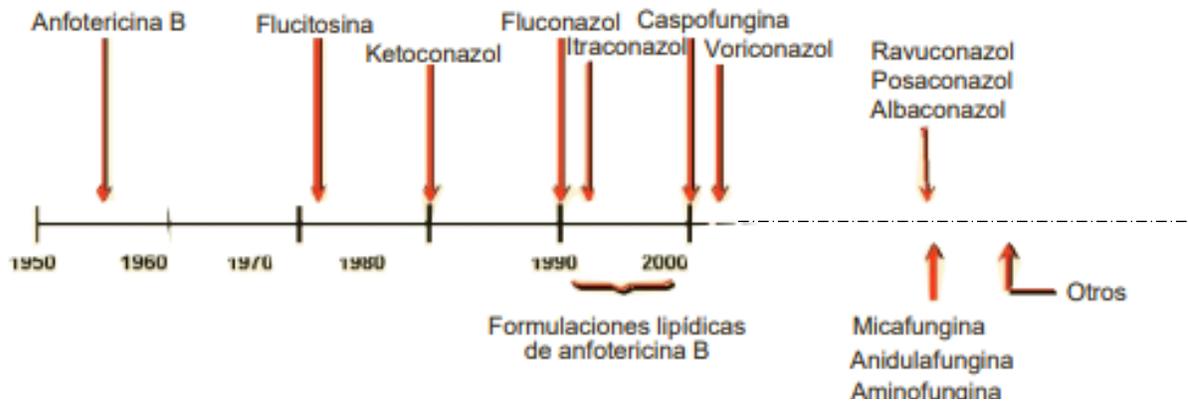
Los antimicóticos son una serie de compuestos que se usan ampliamente en el mundo para el tratamiento de enfermedades ocasionado por hongos en humanos, animales o como pesticidas (Liu *et al.*, 2018; Carvalho., 2016).

En los últimos años ha habido un incremento en el número de casos de infecciones de producidas por hongos. Esto se debe fundamentalmente a 3 factores:

- a) al uso creciente de fármacos inmunosupresores en el tratamiento del cáncer y en la prevención del rechazo en los trasplantes de órganos.
- b) la existencia de enfermedad asociada a déficit inmunitario (SIDA).

c) el uso de antibióticos de amplio espectro durante períodos prolongados (Mediavilla *et al.*, 2008).

Se tiene registro que los primeros usos de fármacos antimicóticos para el tratamiento de enfermedades por micosis se remontan al año 1955 con el desarrollo de anfotericina B, la principal limitante de este fármaco es la nefrotoxicidad, por lo que se buscó variantes de Anfotericina B menos impactantes para el organismo (anfotericina B de dispersión coloidal, la anfotericina B liposomal y la anfotericina B complejo lipídico) y a la vez, el desarrollo de nuevos antimicóticos (Figura 4) para el combate de estas enfermedades (Gregori-Valdés., 2005; Catalán & Montejo., 2006)



**Figura 4:** Evolución cronológica de los antimicóticos (Catalan & Montejo., 2006)

Se cree que pueden llegar a existir más de un millón de especies de hongos y que solo se tienen registro de 200 000 en la actualidad. Los miembros de este reino son variables y comprenden levaduras, mohos, hongos, zetas, los patógenos, ejemplo, *A fumigatus* y *C. albicans*, y una de las más famosas, la fuente de la penicilina, *Penicillium chrysogenum*. Afortunadamente, hasta ahora solo se tiene registro de que cerca de 400 hongos producen enfermedad en los animales y un poco menos son causantes de enfermedades importantes en humanos. Sin embargo, el número de casos de enfermedades ocasionadas por micosis han ido en aumento: un ejemplo son los pacientes con SIDA y los que sufren alteraciones del sistema inmunitario son susceptibles a las infecciones micóticas (Goodman & Gilman., 2007., Castro *et al.*, 2016; Singulani *et al.*, 2019). Para hacerle frente a los patógenos

nicóticos, se utilizan una serie de fármacos antimicóticos cuyo mecanismo de acción, inhibe o mata al hongo (Goodman & Gilman., 2007).

Actualmente, existen varios grupos de fármacos antifúngicos para uso clínico, clasificados con base en su estructura química (Figura 5): polienos, alilaminas, lipopéptidos, pirimidinas, Ionoforos, giseofulvinas, formadores de canales y azoles (Ruiz-Vicente & Moreno-Guillén., 2006; Mendoza-Patiño., 2008; Miguel *et al.*, 2007).



**Figura 5:** Clasificación de los antimicóticos por su estructura química

### 2.3.3.1. Demanda económica global de antimicóticos

La demanda de los antimicóticos es una de las más grandes dentro de los fármacos. Se espera que el mercado mundial de antifúngicos crezca 13.710 millones de dólares en 2025 con una tasa de crecimiento anual compuesta (por sus siglas en inglés CAGR) del 7,4 % (Información obtenida de la página [https://www.researchandmarkets.com/reports/5319159/antifungals-globalmarketreport2021covid19?utm\\_source=BW&utm\\_medium=PressRelease&utm\\_code=rqkpf&utm\\_campaign=1576257++Antifungals+Global+Market+Report+2021%3a+Echinocandins%2c+Azoles%2c+Polyenes%2c+Allylamines++COVID19+Impact+and+Recovery+to+2030&utm\\_exec=chdo54prd](https://www.researchandmarkets.com/reports/5319159/antifungals-globalmarketreport2021covid19?utm_source=BW&utm_medium=PressRelease&utm_code=rqkpf&utm_campaign=1576257++Antifungals+Global+Market+Report+2021%3a+Echinocandins%2c+Azoles%2c+Polyenes%2c+Allylamines++COVID19+Impact+and+Recovery+to+2030&utm_exec=chdo54prd))

### 2.3.4. Azoles

Los antimicóticos azólicos se dividen en dos grupos (Tabla 3): los imidazoles y los triazoles. Ambos grupos comparten el mismo espectro y mecanismo de acción contra los hongos. Pero se diferencian en que los triazoles sistémicos se metabolizan con mayor lentitud y tienen menor efecto en la síntesis de esteroides en el ser humano, en comparación a los imidazoles (Goodman & Gilman., 2007).

**Tabla 3:** Imidazoles y Triazoles más usados en Estados Unidos (Goodman & Gilman., 2007).

<b>Imidazoles</b>	<b>Triazoles</b>
Otrimazol	Terconazol
Miconazol	Itraconazol
Cetoconazol	Fluconazol
Econazol	Voriconazol
Sertaconazol	Posaconazol
Butoconazol	
Sulconazol	
Oxiconazol	

Los antimicóticos azólicos tienen un uso variable, desde productos agrícolas como pesticidas, hasta productos para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por hongos, esto ha resultado en la ocurrencia significativa y generalizada en diferentes matrices tanto acuáticas como terrestres (Castro *et al.*, 2016; Assress *et al.*, 2019).

Estos fármacos fueron recientemente introducidos como una nueva clase de contaminantes ambientales, esto, como ya se mencionó con anterioridad a uso extensivo en productos humanos, agrícolas y de cuidado personal ha resultado en una presencia significativa y generalizada de sus residuos en el medio ambiente, como aguas residuales, aguas superficiales, aguas subterráneas, lodos, sedimentos y suelos modificados con biosólidos Assress *et al.*, (2019).

#### 2.3.4.1. Actividad antimicótica

Como grupo antimicótico, los azoles tienen una gran utilidad en el área médica contra (Tabla 4):

**Tabla 4:** Efecto producido por azoles frente a algunas micosis (Goodman & Gilman., 2007).

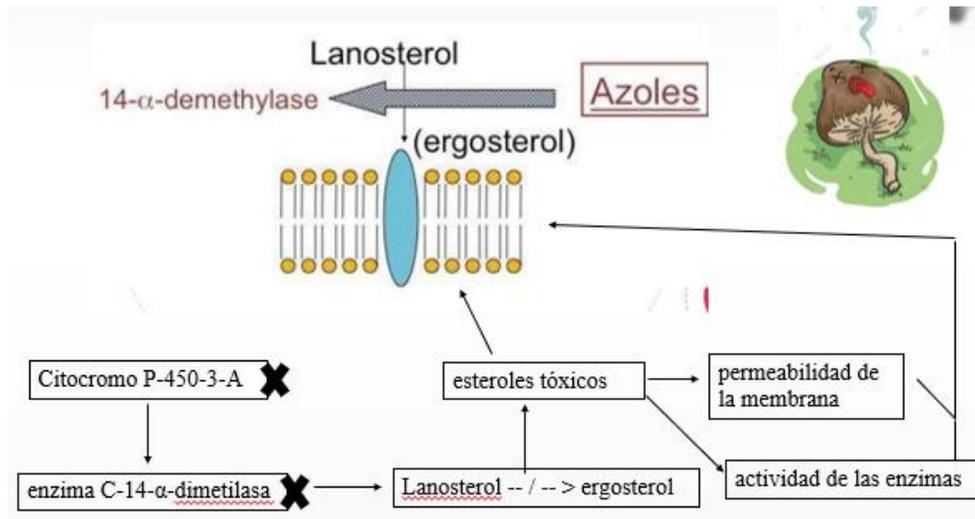
<b>Eficaz</b>	<b>Regular</b>	<b>Poco Eficaz</b>
<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Scedosporium</i>	Y los agentes causales de mucormicosis*
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>apiospermum Fusarium</i>	Bacterias
<i>Candida glabrata</i>	<i>Sporothrix schenck</i>	parásitos
<i>Cryptococcus neoformans</i>		Virus
<i>Blastomyces dermatitidis</i>		
<i>Histoplasma capsulatum</i>		
especies de <i>Coccidioides</i>		
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>		
dermatófitos		

\*Pozaconazol, azol experimental cuyos estudios han demostrado que es un poco eficaz contra mucormicosis

#### 2.3.4.2. Mecanismo de acción de los azoles

El mecanismo de acción de los azoles, consiste en la inhibición. del citocromo P450. Estos metilesteroles alteran el empaquetamiento de las cadenas acilo de fosfolípidos y, con ello,

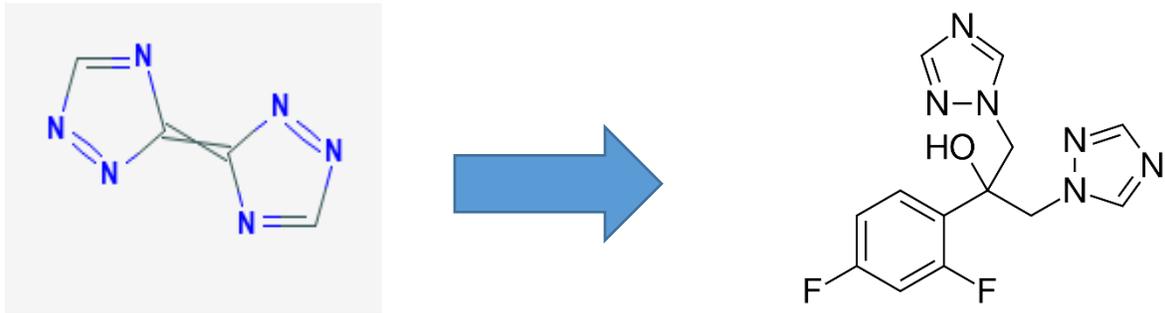
alteran las funciones de algunos sistemas enzimáticos de la membrana, como trifosfatasa de adenosina y enzimas del sistema del transporte electrónico y de esta manera inhibir la proliferación de los hongos (Flores *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2012; Westlund & Yargeau, 2017; De Assis *et al.*, 2018).



**Figura 6:** Mecanismo de acción de los azoles

### 2.3.5. Fluconazol

Este antimicótico derivado del bis-triazol, es el azol que más se usa para tratamiento de infecciones por hongos debido a que tiene una alta efectividad ante este tipo de patógenos *in vitro*. Fluconazol es un azol antimicótico derivado del bis-triazol (figura 5), este fármaco es uno de los más empleados en primera línea para el tratamiento de enfermedades por hongos debido a que tiene una alta efectividad ante este tipo de patógenos *in vitro* (Goodman & Gilman., 2007; Flores *et al.*, 2008).



**Figura 7:** Estructura química, izquierda bis-triazol y derecha fluconazol

FCZ ha mostrado ser efectivo contra: *C. immitis*, *C. neoformans* y *P. brasiliensis*. coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis u hongos no filamentosos y carece de actividad frente a *Aspergillus Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. y *Penicillium* spp (Goodman & Gilman., 2007; Flores *et al.*, 2008; Assress H. A *et al.*, (2019)).

#### 2.3.5.1.Ficha técnica de fluconazol

En la siguiente tabla (tabla 5), se muestra información fisicoquímica, composición y otra información sobre el activo fluconazol:

**Tabla 5:** Ficha técnica de fluconazol (DrugBank., s.f; PubChem., 2020).

CARACTERISTICAS	VALOR
Estructura	
Nombre IUPAC	2- (2,4-difluorofenil) -1,3-bis (1H-1,2,4-triazol-1-il) propan-2-ol
Formula	C13H12F2N6O

<b>Metabolitos</b>	N-óxido de fluconazol
<b>Peso molecular</b>	306.27 g/mol
<b>pKa</b>	1.76
<b>Volumen de Distribución</b>	0,8 L kg <sup>-1</sup>
<b>Constante de Disociación</b>	2.03 a 37 °C
<b>Biodisponibilidad</b>	0%
<b>Unión a proteínas</b>	11 a 12%
<b>Vida media</b>	30 hrs
<b>Solubilidad</b>	4,363 mg/L at 25 °C (Soluble en agua)
<b>Reino</b>	Compuestos orgánicos
<b>Clase</b>	Benzenos
<b>Subcategoría</b>	Inhibidores del citocromo P-450 CYP2C9
<b>Toxicidad oral aguda (DL50):</b>	1271 mg / kg (rata)

### 2.3.5.1. Farmacodinamia de fluconazol

Estudios científicos han demostrado que el FCZ tiene actividad fungistática contra la mayoría de las cepas de los siguientes microorganismos, siendo un tratamiento alternativo ante estas (FDA, s.f):

*Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida tropicalis, Cryptococcus neoformans.*

Esto es mediante de la inhibición de los esteroides en las células fúngicas, lo que afecta la síntesis y disminuye el crecimiento de la pared celular, así como con la adhesión celular, lo que trata las infecciones fúngicas y sus síntomas. (FDA, s.f; Hollier & Cox., 1995; Lewis., 2011)

La actividad antimicótica de FCZ también se ha demostrado mediante estudios científicos en modelos animales normales e inmunocomprometidos con infecciones micóticas sistémicas por *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* (FDA, s.f). Es importante señalar que se han encontrado organismos resistentes contra varias cepas. de organismos tratados con FCZ. Esto demuestra que es necesario realizar pruebas de susceptibilidad cuando se considera que el FCZ como una terapia antifúngica. (Jessup *et al.*, 1998; Alastruey *et al.*, 2015; Nasrollahi *et al.*;2015; de Carvalho *et al.*, 2017)

### 2.3.5.2. Farmacocinética de fluconazol

#### *Absorción*

FCZ una vez que ingresa en el cuerpo humano se absorbe en las vías gastrointestinales, tiene un volumen de distribución bajo (Vd de 0,8 L/kg), lo que su probabilidad de almacenarse en tejidos u órganos es casi nula (*Flores et al.*, 2008; Goodman & Gilman., 2007).

#### *vía de entrada y distribución*

FCZ se administra vía intravenosa u oral, tiene unión a proteínas plasmáticas (entre el 11 a 12%) permitiéndole alcanzar concentraciones similares en LCR (líquido cefalorraquídeo), saliva, esputo y fluido vaginal (Goodman & Gilman., 2007; Mediavilla *et al.*, 2008).

#### *Excreción*

La excreción renal representa más entre el 80 a 90% de la eliminación y la semivida es de 25 a 30 hrs. Penetra fácilmente en líquidos corporales, incluidos esputo y saliva. Las concentraciones en el (LCR) son de 50 a 90% de los valores simultáneos en plasma (Goodman & Gilman., 2007; Mediavilla *et al.*, 2008).

### 2.3.5.3. Interacción con otros fármacos

Los azoles (incluido FCZ) inhiben diversas isoformas del citocromo P450, isoenzima 2C9 y moderado del CYP3A4, además FCZ es un inhibidor de la isoenzima CYP2C19, de acuerdo con su mecanismo de acción, y como consecuencia ocasiona la inhibición del metabolismo de otros fármacos, que son metabolizados por esta vía, y por lo siguiente habrá un aumento de sus concentraciones plasmáticas. Esto ocurre con inmunosupresores, anticoagulantes orales, antihistamínicos H1, algunas estatinas, benzodiazepinas, inhibidores de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y antagonistas del calcio. Por otro lado, la rifampicina y otros fármacos que inducen el citocromo P450 disminuyen los niveles de los azoles, un efecto neutralizante hacia los azoles. Para evitar las consecuencias de estas interacciones, se recomienda reducir dosis y vigilar la posible toxicidad o modificación a los mecanismos de acción que llegasen a producirse o simplemente evitar la asociación del consumo de FCZ con ninguno de los fármacos anteriormente mencionados (Mediavilla *et al.*, 2008).

#### 2.3.5.4. Fuentes y destino de fluconazol en el medio ambiente.

Como ya se mencionó en un apartado anterior, FCZ se puede ingerir vía oral o intravenosa y debido a sus propiedades fisicoquímica, permite que este compuesto tenga como vía de salida a través de excreciones de orina y heces, permitiéndole llegar a matrices acuáticas mediante desechos domésticos o hospitalarios Chen & Ying; (2015).

Su reciente incorporación de FCZ y otros antifúngicos como contaminantes emergentes, han sido puestos en la mira, ya que pueden llegar al medio receptor a través de la descarga directa o indirecta de aguas residuales, lo que plantea riesgos potenciales para los organismos no objetivo (ejemplo, alteración endocrina) y plantas (ejemplo, retraso del crecimiento) (Assres H. A *et al.*, 2019). Además, el aumento del uso de azoles ha dado lugar a la aparición de especies de hongos menos susceptibles y resistentes a los fármacos. Debido a las preocupaciones tanto por los organismos no objetivo como por el riesgo potencial para la salud de los seres humanos, la determinación confiable de los azoles en diferentes matrices ambientales es esencial (De Sà *et al.*, 2018; Assres H. A *et al.*, 2019).

#### 2.3.5.5. Ocurrencia de fluconazol

Estudios previos han encontrado la presencia de fluconazol en diferentes matrices acuáticas alrededor del mundo (Tabla 6)

**Tabla 6:** Presencia de FCZ alrededor del mundo

<b>País</b>	<b>Lugar de Muestra</b>	<b>Concentración</b>	<b>Referencia</b>
Suiza	Aguas residuales de la depuradora municipal ubicada en Zúrich	10 y 100 ng L <sup>-1</sup>	(Kahle <i>et al.</i> , 2008)
China	Aguas residuales municipales	109.6 ng L <sup>-1</sup> .	(Huang <i>et al.</i> , 2013)

España	Muestras de efluentes	20-93 ng L <sup>-1</sup>	(Casado et al., 2014)
	Muestras de influentes	37-95 ng L <sup>-1</sup>	
Canadá	aguas residuales del efluente de tres plantas de tratamiento de aguas residuales	3-27000 ng L <sup>-1</sup>	(Westlund & Yargeau., 2017)
Brasil	Muestras en rio	98.7 ng L <sup>-1</sup> .	(De Barros <i>et al.</i> , 2018)
		63-1292 ng L <sup>-1</sup>	(Reis <i>et al.</i> , 2019)
		35-2100 ng L <sup>-1</sup>	(Santos <i>et al.</i> , 2020)
Sudáfrica	Planta de tratamiento de aguas residuales	302.38 ng L <sup>-1</sup>	(Assress <i>et al.</i> , 2019)
	Planta de tratamiento de aguas residuales	9959 ng L <sup>-1</sup> , 3077 ng L <sup>-1</sup> y 331 ng L <sup>-1</sup>	(Assress <i>et al.</i> , 2020)
<b>Unión Europea</b>	Diferentes matrices acuáticas	Promedio: 100 ng L <sup>-1</sup>	(Loos <i>et al.</i> , 2013)

### 2.3.5.6. Estudios toxicológicos

No solo se han realizado estudios de recurrencia, también se han realizado estudios donde se analizan los efectos toxicológicos en diferentes organismos como se muestran en la siguiente tabla 7

**Tabla 7:** Estudios toxicológicos de FCZ en organismos acuáticos

<b>Efecto</b>	<b>Organismo</b>	<b>[C] ng L-1</b>	<b>Referencia</b>
Inhibición	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3,063 4,594	(Chen <i>et al.</i> , 2014)
Inmovilización	<i>Damnia Magna</i>	2,766.423 183.493	(Chen & Ying; 2015)
Degradación de la vesícula germinal	<i>Danio rerio</i>	3000	(Katti <i>et al.</i> , 2020).
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0, 16.8, 52.4, 164, 512, 1600 5000 nM	(Beijer <i>et al.</i> ; 2018)
Toxicidad aguda	<i>Gobiocypris rarus</i>	0.2 e 15	(Zhu <i>et al.</i> ; 2014)
	<i>Oryzias latipes</i>	-----	(Kim <i>et al.</i> ; 2009)
Disminución en el conteo de	<i>Labeo rohita</i>	100, 200, 300	(Saha <i>et al.</i> ; 2017)

células sanguíneas			
Bioacumulación en órganos	<i>Salmo salar</i>	0.2, 2 y 20 mg/L	(Vestergren <i>et al.</i> ; 2012)

Analizando más a profundidad el estudio de Katti *et al.*, (2020) donde reportaron que en *Danio rerio* a una concentración de 3 000 ng L<sup>-1</sup> hay una degradación de la vesícula germinal lo que puede atribuirse a la actividad inhibidora de la enzima del citocromo P450, ya que en hongos inhibe la enzima 14 $\alpha$ -desmetilasa del citocromo, lo que ocasiona que el lanosterol se convierta en ergosterol, un componente esencial de la membrana citoplásmica fúngica además de permitir la acumulación de los 14- $\alpha$ -metilesteroles (Flores *et al.*,2008).

## 2.4. Bioensayos

Para la determinación de la ocurrencia y de los efectos toxicológicos de un contaminante se realizan ciertos estudios como bioensayos, estos son técnicas de evaluación de los efectos tóxicos agudos o crónicos, tanto de sustancias químicas conocidas como de muestras ambientales de composición incierta (Silva *et al.*, 2007). La ventaja de los bioensayos sobre las otras técnicas utilizadas es la rapidez, facilidad, bajo costo y el obtener un efecto global de los contaminantes presentes en la muestra, ya que los vertidos de los contaminantes al medio acuático suelen ser discontinuos o puntuales (Contero & Felicita., 2006).

La presencia de sustancias exógenas en el medio ambiente modifica el equilibrio del ecosistema, implicando un riesgo para la salud de los organismos que lo habitan. Para ello se requiere hacer ensayos *in vivo* sobre los organismos, para corroborar que el daño es causado por el contaminante a nivel molecular, bioquímico y/o celular.

### 2.4.1. Bioindicador

El uso de organismos vivos como indicadores de la contaminación es necesaria para conocer la presencia de los contaminantes en el ambiente y su efecto que estos tienen sobre los seres vivos, a estos organismos usados con este fin se les denomina bioindicadores. Un bioindicador puede ser una especie de hongo, vegetal o animal, cuya presencia nos da información sobre ciertas características ecológicas del medio ambiente o sobre el impacto de ciertas prácticas en el medio (León, 2015).

Los bioindicadores deben cumplir con las siguientes características:

- 1) suficientemente disperso en el territorio de interés
- 2) tener un tamaño considerable que permite hacer estudios en diversos tejidos y órganos
- 3) tolerar los contaminantes a concentraciones similares a las encontradas en el medio sin efectos letales
- 4) sobrevivir en condiciones de laboratorio
- 5) ser reproducible
- 6) sensible al estrés por xenobióticos (Díaz & Gómez, 2013).

#### 2.4.2. Ensayos toxicológicos y su normatividad

La OECD ha propuesto ensayos toxicológicos para la evaluación de químicos mediante métodos de prueba acordados y aprobados internacionalmente, teniendo un amplio uso en área industrial, gubernamental y laboratorios. Dentro de estas guías, está la prueba de No. 236 “Prueba de toxicidad aguda de embriones de peces (FET)” publicada en el 2013 que establece ciertas pautas para la evaluación de perfiles embriotóxicológicos y teratogénicos en peces *Danio rerio* y algunas variantes de la familia ciprinidae (Hill *et al.*, OECD, 2013; Luján-Mondragón., 2019).

Los peces han tenido un papel muy importante como bioindicadores de primera línea ante contaminación acuática creciente en los últimos años, ya que se encuentran en contacto directo con los contaminantes presentes en el agua (Velásquez & Vega., 2004) lo que permite estudiar los efectos embriotóxicológicos y teratogénicos de dichos contaminantes, siendo

*Danio rerio* un bioindicador por excelencia, que en comparación a otros modelos acuáticos tiene mayor similitud con el ser humano, genéticamente (Hill *et al.*, 2005).

## 2.5. Biomarcadores

Una respuesta toxica es representada con la selección adecuada de biomarcadores. Estos se definen como cambios cuantificables representativos en la respuesta biológica, física o química, que pueden estar relacionados con los efectos tóxicos o la exposición a químicos ambientales, y cumplen con las siguientes características (van der Oost *et al.*, 2003):

- a) Indican la presencia de un contaminante biodisponible, más que la forma inerte del mismo.
- b) Pueden revelar la presencia de un contaminante que no se sospecha que existe en el lugar de estudio.
- c) Son más fáciles de innovar y más económicos que los análisis químicos comunes.

Los biomarcadores se clasifican en 3 grupos (van der Oost *et al.*, 2003):

- a) **De exposición:** se busca la detección y medición de sustancias exógenas, sus metabolitos o los productos de interacción entre agentes xenobióticos-organismo, siendo más específico, algunas moléculas o células objetivo medidos en un compartimiento dentro de un organismo.
- b) **De efecto:** se busca adjuntar la valoración bioquímica, fisiológica y/u otras alteraciones dentro del tejido o fluidos corporales de un organismo que puedan ser reconocidos y asociados con una afectación negativa en la salud de dicho organismo.
- c) **De susceptibilidad:** es la habilidad adquirida por un organismo para responder a los cambios producidos por la exposición a un agente específico, incluyendo factores genéticos y cambios en receptores los cuales alteran la susceptibilidad del organismo expuesto.

Las matrices acuáticas son afectadas por la contaminación ambiental debido a la descarga continua de tóxicos a los cuerpos de agua, ya sea por proximidad al sitio de uso, derrames

accidentales o deriva de agroquímicos. Existen numerosas evidencias que indican que muchos de estos agentes contaminantes, al llegar a los cuerpos de agua, son absorbidos por los organismos que allí habitan y pueden desencadenar en ellos el proceso de EO (Fassiano *et al.*, 2013; Assress *et al.*, 2019).

## 2.6. *Danio Rerio*

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pequeño pez (ver figura 6) de agua dulce originario de la India, aunque es común hallarlo en acuarios de todo el mundo pues se ha popularizado como mascota (Vargas; 2017). Esto implica que su adquisición es relativamente fácil y debido a que tiene una alta capacidad de reproducción, el riesgo de extinción es bajo, por lo tanto, no es una especie protegida (Arunachalam *et al.*, 2013). Los organismos de esta especie presentan las siguientes características: tamaño pequeño, presentan un color de fondo dorado o plateado, con cinco bandas longitudinales que comienzan detrás del opérculo y llegan hasta el extremo de la aleta caudal, es a esta la característica a la que se debe su nombre (pez cebra), la aleta anal también esta rayada, no así la dorsal (Ayala., 2014).



**Figura 8:** *Danio rerio* (pez zebra)

El pez cebra es un modelo animal emergente cuyas cualidades lo han posicionado como una alternativa por excelencia para determinar las respuestas toxicas a los contaminantes: poseen una etapa de mayor sensibilidad durante la fase embrionaria, tiene alta fecundidad, posee un

desarrollo rápido desde el estadio embrionario hasta adulto y el costo de la infraestructura, los insumos y los reactivos necesarios para su crianza y reproducción son bajos (Vargas., 2017), además de que los óvulos son transparentes permiten la visualización de anomalías morfológicas y estructurales en el cuerpo después de la exposición a productos químicos (Pandey & Guo., 2014).

Debido a todas estas características, *Danio rerio* ha adquirido gran importancia en los campos de la genética del desarrollo, la genómica funcional, la toxicología acuática, la neurociencia y muchas otras áreas de la investigación biomédica como bioindicador (Arunachalam *et al.*, 2012).

## 2.7. Embriotoxicidad y teratogenicidad

El periodo de organogénesis es uno de los periodos más sensibles y susceptibles a alteraciones si se exponen los embriones de diversas especies a diferentes sustancias xenobióticas, estos agentes denominados teratógenos, puede alterar el desarrollo normal a través de varios mecanismos de acción, propiciando la muerte del embrión o la aparición de malformaciones (Giavini & Menegola., 2012).

Aunque algunas especies reactivas tienen un papel en el desarrollo embrionario normal, al incrementarse la transferencia de oxígeno junto con la generación celular y en ocasiones estas especies están implicadas en la transducción de señales. Se puede considerar al incremento del estrés oxidativo uno de los mecanismos teratógenos, ya que alteran la composición de macromoléculas, modifican la traducción de señales que se da en la organogénesis o incluso pueden causar rupturas de ADN, por lo que la actividad de defensas antioxidantes durante el desarrollo embrionario es primordial (Giavini & Menegola., 2012; Thompson & Al-Hasan., 2012; Wells *et al.*, 2009).

## 2.8. Estrés oxidativo

La determinación de estrés oxidativo y la actividad antioxidante es una evaluación que permite evaluar la calidad ambiental debido a la gran cantidad de sustancias tóxicas que pueden inducir este tipo de respuesta (Carmona & Mantilla., 2008; Galar *et al.*, 2010).

El estrés oxidativo se define como un estado de la célula en el cual hay una alteración en la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir, un desbalance entre prooxidantes y antioxidantes. Esto es ocasionado por una producción alta de especies reactivas y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes conduciendo a un daño celular (Dorado *et al.*, 2003).

Este daño es generado por los radicales libres, que son moléculas inestables y altamente reactivas al tienen electrones desapareados que reaccionan con los electrones de compuestos cercanos. Estos radicales libres pueden atacar tejidos biológicos como las membranas a través de la lipoperoxidación, causar daño sobre las proteínas como el grupo carbonilo (C=O), generado al oxidar los aminoácidos y pueden causar daño oxidativo al DNA (Dorado *et al.*, 2003).

Por eso algunos organismos anaerobios han evolucionado a tal grado, que desarrollaron mecanismo que le permiten eliminar los radicales libre de su organismo, el resultado de estos mecanismos el desarrollo de enzimas como las antioxidantes. Las mas importantes son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la Glutación Peroxidasa (GPx). La determinación del estado de estrés oxidativo se basa en la modificación de las moléculas causada por los radicales libres y la actividad de las enzimas y/o moléculas antioxidantes (Yoshikawa & Naito., 2002; Mañon *et al.*, 2016).

### 2.8.1. Radicales libres

Los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas, o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera gran inestabilidad y desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas que se producen por diferentes mecanismos como la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con

las principales moléculas del organismo. Los radicales libres (RL) más importantes de las células aerobias (como las células humanas), son el oxígeno, el súper óxido, los radicales de hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. La oxidación de las biomoléculas se debe a la formación de estos radicales libres (moléculas empleadas dentro de las células, en especial a los lípidos) y esto conlleva a la muerte celular, debido a que el ADN es muy sensible a la oxidación ocasionada por los radicales libres (Venero-Gutierrez, 2002; Dorado *et al.*, 2003).

### 2.8.2. Especies Reactivas de oxígeno (ERO)

Las especies reactivas son aquellas moléculas que contienen un electrón no apareado, característica que las hace altamente reactivas y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que fácilmente pueden transformarse en radicales libres lo que les proporciona la característica de ser compuestos nocivos para las células.

Algunas especies reactivas más comunes tenemos el oxígeno atómico (O) y el ozono (O<sub>3</sub>), al oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), al superóxido (O<sub>2</sub>), al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y al radical hidroxilo (·OH) (Konigsberg, 2008). Las ERO en concentraciones bajas estimulan el crecimiento de las células o de algunos microorganismos como las bacterias, además de tener un papel importante para la diferenciación y la muerte celulares programada (Konigsberg, 2008).

Otro papel importante es que las ERO también están involucradas en el sistema inmunológico innato y tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria; atraen células, por quimiotaxis, al sitio de la inflamación (Cezar-Login *et al.*; 2019).

El (O<sub>2</sub>) reacciona con la mayoría de los compuestos celulares, con la membrana plasmática, los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono muy cerca del sitio donde se forma. Interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos siendo el producto principal la 8- hidroxiguanina. Las reacciones entre NO (Óxido nitroso) y ERO, como los radicales superóxidos (O<sub>2</sub>), conducen a la producción de un potente radical prooxidante

(peroxinitrito), lo que induce una disfunción endotelial y mitocondrial (Cezar-Login *et al.*; 2019).

La toxicidad de ( $O_2$ ) se debe a que puede formar ( $^1O_2$ ) y ( $\cdot OH$ ), asociado a la reacción con algunos metales de transición con los que produce el radical ( $\cdot OH$ ) que interacciona irreversiblemente con las proteínas y el ADN.

El ( $\cdot OH$ ) se produce principalmente por la reacción de Fenton. Es uno de los compuestos más reactivos que existen, puede oxidar a las bases púricas y pirimídicas, así como a la desoxirribosa, además puede producir rupturas en el ADN. También reacciona con cualquier aminoácido en el sitio que se origina, incluso con los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

## 2.9. Expresión génica

El término expresión génica se utiliza para referirse al proceso el cual la información codificada en un gen se transcribe en uno o varios RNA funcionales. Esta expresión de un gen inicia con un mecanismo de transcripción controlado por proteínas llamadas factores transcripcionales (FT), estos están regulados por señales recibidas por células, y concluye con la producción de un ARN funcional y, después, en el caso de los ARNm, con la traducción de una proteína. Los FT son proteínas de unión al ADN que reconocen una secuencia específica y son indispensables para el encendido y apagado de los genes. La expresión de un gen se regula en niveles diferentes, desde el comienzo hasta su culminación (Salazar *et al.*; 2013).

La expresión génica es un proceso dinámico e imprevisto, que resulta en heterogeneidad en una población isogénica (Brouwer *et al.*, 2019). La tecnología ha dado pasos muy grandes para dicha heterogeneidad, pero aun quedan detalles para lograr una imagen completa.

Los últimos avances recientes en tecnología enfocada en microscopía de fluorescencia *in vivo* han demostrado que es posible observar directamente la unión y difusión de factores de transcripción individuales en el núcleo de las células vivas. Se encontró que los TF se unían

al ADN en una escala de tiempo de segundos, lo que ha llevado a una visión dinámica de la regulación de la transcripción (Liu *et al.*, 2018; Swindtead *et al.*, 2018).

### 3. Planteamiento del problema

Más del 70% de los cuerpos de agua en México presentan algún tipo de contaminación según el Primer Informe Contraloría Social reportado por la CONAGUA., (2017), entre los contaminantes presentes en el agua tenemos a los fármacos de tipo antimicóticos.

México no cuenta con normas que regulen la liberación de estos contaminantes a cuerpos de agua, la única norma disponible es la NOM 001 de la SEMARNAT, la cual no ha sido modificada desde 1996 (SEMARNAT., 1996) y solo incluye ciertos parámetros fisicoquímicos, pero no de productos que contengan algún tipo de antimicóticos, lo que la hace obsoleta para controlar este tipo de contaminantes emergentes.

En los últimos años fluconazol junto con otros azoles entraron a la lista de contaminantes emergentes de la unión europea debido a su alta ocurrencia en cuerpos de agua, además de ciertos estudios toxicológicos que demuestran el riesgo de este fármaco ante la vida acuática y la salud humana (Antonioniou *et al.*, 2013; Assress *et al.*, 2019). Lo anterior hace necesario que se establezca de manera formal el perfil ecotoxicológico de los contaminantes emergentes con la finalidad de proponer medidas regulatorias y de tratamiento de aguas, que mejoren la calidad hídrica.

### 4. Pregunta de investigación

¿Las concentraciones ambientalmente relevantes de FCZ en cuerpos de agua son capaces que generar daño en ovocitos fertilizados de *Danio rerio*, tales como embriotoxicidad y teratogénesis, estrés oxidativo o alteraciones en expresiones génica?

## 5. Hipótesis

La exposición de ovocitos recién fertilizados de *Danio rerio* a concentraciones ( $\text{ng L}^{-1}$ ) de FCZ inducirá embriotoxicidad y teratogenicidad, estrés de oxidativo, y además de evaluar los posibles daños involucrados en la expresión génica.

## 6. Objetivo general

- Evaluar la embriotoxicidad y teratogenicidad, estrés oxidativo y además de una evaluación que involucra la expresión génica mediante la exposición a FCZ en ovocitos de *Danio rerio* (pez cebra).

### 6.1. Objetivos específicos

- Evaluar el daño al desarrollo embrionario producido por FCZ a sobre *Danio rerio*.
- Determinar el índice teratogénico ( $CL_{50}/CE_{50}$ ).
- Identificar y cuantificar las malformaciones del desarrollo en *Danio rerio*, inducidas por la exposición a FCZ.
- Evaluar el estrés oxidativo inducido por FCZ en ovocitos de *Danio rerio*.
- Evaluar los efectos involucrados en expresión génica en ovocitos de *Danio rerio* expuestos a FCZ.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Mantenimiento de los progenitores

Para la producción de huevos se utilizó una población reproductora de pez cebra de tipo salvaje, con un periodo previo de aclimatación de dos meses en el laboratorio. Los peces

estuvieron libres de síntomas de infección y enfermedad y no recibieron ningún tratamiento farmacéutico durante 2 meses antes del desove. Los peces reproductores se mantuvieron en acuarios con una capacidad de carga recomendada de 1 L de agua por pez, separados machos de hembras, con un fotoperíodo natural y a una temperatura de 27°C. Se alimentaron con alimento en hojuelas comercial, esto hasta una semana antes del desove, cuando se cambiará este alimento por *Artemia sp.* Se realizó la limpieza del acuario cada tres días (OECD, 2013).

## 7.2. Producción de ovocitos y fertilización

Los huevos de pez cebra se produjeron en tanques de desove individuales, en los cuales se colocaron los grupos de desove: hembras y machos en una proporción de 4:2. En el tanque de desove se colocaron unas horas antes del inicio de la oscuridad el día anterior a la prueba (a las 17 horas del día), con 10 L agua corriente con sales marinas (en la proporción indicada por el fabricante) y anticloro, con un termostato a temperatura de 27 °C; se usaron al menos tres tanques de desove en cada ensayo. Para evitar el sesgo genético, los huevos se recolectaron de un mínimo de tres grupos de reproducción, mezclados y seleccionados al azar (OECD, 2013).

Para la recolección de los huevos se colocaron trampas de desove, las cuales consistieron en cajas de malla de 0.5 cm de poro, estas se colocaron en los tanques de desove, esto para la formación de una barrera entre los organismos progenitores y los huevos evitando la depredación de estos. Dentro de los 30 minutos posteriores al inicio de la luz del día siguiente a la colocación de los tanques se llevó a cabo el apareamiento, la hembra dieron lugar al desove y el macho fertilizó los ovocitos ya fuera de la hembra. Para la recolección de los huevos se retiraron cuidadosamente las trampas de desove y se recolectaron por medio de succión cuidado el daño físico de estos. Una vez recolectados se enjuagaron en una solución fisiológica durante un minuto, posteriormente se colocarán en el medio para *Danio rerio* con agua corriente, anticloro y sales para acuario (1ml L<sup>-1</sup>) (OECD, 2013). Para los estudios de embriotoxicidad y teratogenicidad, solo se usaron los ovocitos fertilizados, en el período de

la blástula a las 3 h después de la fertilización. Los cuales se expusieron a concentraciones ambientalmente relevantes de fluconazol.

### 7.3. Exposición

El experimento se llevó a cabo bajo las pautas establecidas por la OCDE en su guía de prueba No. 236 “Prueba de toxicidad aguda de embriones de peces *Danio rerio* (FET)”, del 2013 para las pruebas de desarrollo embrionario y efectos teratogénicos de FCZ.

Para este estudio se usaron concentraciones ambientalmente relevantes de FCZ más un grupo control (que estuvo libre de fármaco). Los sistemas de prueba consistieron en microplacas de 24 pocillos, donde se colocaron un ovocito fertilizado seleccionado al azar, donde se formaron lotes de 20 ovocitos por cada concentración de FCZ. Las microplacas se mantuvieron en el laboratorio durante 96 horas a una temperatura de  $28 \pm 1$  °C y con fotoperiodos naturales de luz y oscuridad (12 horas y 12 horas respectivamente). Se hicieron observaciones a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf, utilizando el programa Zeiss para Windows, y se tomaron fotografías de las malformaciones que se presenten en cada huevo de *Danio rerio*. Las pruebas se realizaron por triplicado.

#### 7.3.1. Evaluación del perfil de embriotoxicidad.

Se usaron sistemas similares a los mencionados en la sección 7.3. Se observaron 60 ovocitos por cada concentración de FCZ con un microscopio estereoscópico. Se hicieron observaciones hasta 96 hpf y se consideró la letalidad en los ovocitos coagulados o cuando no se detectó latidos cardíacos. Posteriormente, los ovocitos vivos, muertos y malformados se cuantificaron. Con estos datos se determinó la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) y la concentración efectiva de malformaciones 50 (CE<sub>50</sub>) mediante un análisis de regresión lineal de máxima verosimilitud. Se calculó la CL<sub>50</sub> y la CE<sub>50</sub>, así como los límites de confianza del 95%. Las pruebas se realizaron por triplicado.

### 7.3.2. Cálculo de LC50, EC50s e índice teratogénico (TI) para fluconazol

Se utilizó el método recortado de Spearman-Kärber para el cálculo de la CL<sub>50</sub> y la EC<sub>50</sub>, utilizando el software US-EPA. (Hamilton *et al.*, 1977). El índice teratogénico de FCZ se calculó mediante el cociente entre CL<sub>50</sub> y EC<sub>50</sub> de malformaciones. Considerando que, si el valor del índice teratogénico es mayor que 1, FCZ se considerará teratogénico y si su valor es menor que 1, se considerará como embrioletal (Weigt *et al.*, 2011).

### 7.3.3. Evaluación del perfil embriotóxico y teratogénico para fluconazol

Se usaron sistemas similares a los mencionados en la sección 7.3 de material y los métodos. Los embriones de *Danio rerio* se observaron bajo un microscopio estereoscópico a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf. Se evaluaron las malformaciones en el desarrollo embrionario, se utilizó el puntaje establecido por Hermsen *et al.* (2011). Las malformaciones teratogénicas inducidas por FCZ se identificaron con la misma escala. Los datos que se obtuvieron de las principales malformaciones inducidas por el fármaco se utilizaron para crear un histograma de frecuencia.

## 7.4. Determinación del estrés oxidativo

Para este experimento colocamos 10 sistemas en acuarios de 10 L de capacidad, asegurando que cada sistema tuviera 1 g de embriones (aproximadamente 1600 embriones) y siguiendo los estándares de Elizalde Velázquez *et al.*, (2021a); Elizalde Velázquez *et al.*, (2021b). Expusimos todos los sistemas a cada una de las concentraciones de FCZ anteriores (Sección 7.3.3.: Prueba de embriotoxicidad) y mantuvimos una temperatura constante de  $28 \pm 1$  °C. A las 72 y 96 hpf, la mitad de los organismos supervivientes se seleccionaron y homogeneizaron en tampón fosfato (PBS pH 7,4). A continuación, dividimos el homogeneizado de cada sistema en dos tubos Eppendorf. El tubo 1 contenía 300 µL de homogeneizado y 300 µL de solución de ácido tricloroacético (20%) y se utilizó para evaluar los niveles de carbonilación de proteínas (POX), lipoperoxidación (LPX) y contenido de hidroperóxido (HPC). El tubo 2

contenía 700 µL de homogeneizado y se utilizó para evaluar la actividad antioxidante de las enzimas: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX). La Tabla 8 resume los métodos que usamos para medir cada uno de los biomarcadores de estrés oxidativo.

**Tabla 8:** Métodos utilizados para evaluar biomarcadores de estrés oxidativo en los embriones

	<b>Biomarcador</b>	<b>Método usado</b>
Tubo 1	LPx	(Buege <i>et al.</i> , 1978)
	HPx	(Jiang <i>et al.</i> , 1992)
	POx	(Levine <i>et al.</i> , 1994)
Tubo 2	SOD	(Misra <i>et al.</i> , 1972)
	GPx	(Gunzler <i>et al.</i> , 1985)
	CAT	(Radi <i>et al.</i> , 1991)

### 7.5. Análisis integrado de respuesta de biomarcadores

Para calcular los valores de respuesta de biomarcadores integrados (IBR) de todo el estrés oxidativo, primero obtuvimos la relación entre los biomarcadores de cada grupo de tratamiento ( $X_i$ ) y los biomarcadores del grupo de control ( $X_o$ ). Una vez que calculamos la relación  $X_i/X_o$ , transformamos logarítmicamente sus valores ( $Y_i$ ) y luego los estandarizamos con la siguiente fórmula  $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ , donde  $\mu$  y  $s$  son la media y la desviación estándar de  $Y_i$ , respectivamente.

A continuación, estimamos el índice de desviación del biomarcador (A) realizando una diferencia de  $Z_i$  y  $Z_o$ . Finalmente, sumamos cada valor absoluto de A para obtener los valores de IBR. Con los valores de A, representamos las respuestas integradas de cada biomarcador en un gráfico de estrellas.

### 7.6. qRT-PCR

Se aisló el ARN de las larvas restantes de la prueba de embriotoxicidad utilizando el kit RNeasy® de Qiagen. Después del aislamiento, las concentraciones de ARN se determinaron mediante la relación 260/280 utilizando un espectrofotómetro (THERMO Scientific NanoDrop 2000/2000c). Además, las purezas de las muestras se evaluaron usando

electroforesis en gel de agarosa (1%). Realizamos las reacciones de transcripción inversa utilizando 1,0 µg de RNA total y el kit de transcripción inversa QuantiTect® (QIAGEN, Hilden, Alemania, REF 205313). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 42 °C durante 15 min y 95 °C durante 3 min. El cDNA se usó como plantilla para qRT PCR.

Los genes probados [Tabla 9] estaban involucrados en diferentes vías biológicas relacionadas con la toxicidad de FCZ. qRT-PCR se realizó utilizando un Rotor-Gene Q (Qiagen). Realizamos cada reacción en una solución de 50 µL que contenía cebadores de 0,3 µmol, 25 µL 2x SYBER Green QuantiTect® (QIAGEN, Hilden, Alemania) y 500 ng de plantilla de ADNc. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 94 °C durante 15 s, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 15 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. Se usó actina B como gen de limpieza para normalizar todas las muestras.

**Tabla 9:** Genes usados para qRT-PCR

<b>Gen</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer reverse</b>	<b>Referencia</b>
Nrf1	TTT GGT TCC CGA TGA AGA CG	TGA TTA GCG TGA GAC TGA GC	(Sant <i>et al.</i> , 2007)
Nrf2	ACC CAA TAG ATC TAC AGA GC	GGT GTT TGG ACA TCA TCT CG	(Pradhan <i>et al.</i> , 2015)
CYP26A1	AGG CCA TTA TGA GGG CGT TC	AGT ACT GGC GGT GGT TTC AT	(Chen <i>et al.</i> , 2014)
CYP26B1	GGG GCA GAG AAT GTG CGT AA	TGT TGT TCT CCT TGG CGC TT	(Zayed <i>et al.</i> , 2020)
WNT3A	TAC GCC TTC TTC AAG CAT CC	CTC TTT GCG CTT TTC TGT CC	(De la Paz <i>et al.</i> , 2017)
WNT8A	CAA GCA AGG AAG TTG GAG ATG G	CGC ATT TGA CTG TGC AGC AC	Wollam & Antebi., 2011)
NRD1	CAC AAG AGC GTT CAT CAT CCT	TGG GAA ACA CCA GGA ATC AT	(Linares <i>et al.</i> , 2013)
NRD2	GGT CGG GAG ATT CAT AGC AG	CGT CCT CGC TTG ACT TCT TT	(Linares <i>et al.</i> , 2013)

### 7.7. Cuantificación de FCZ en agua

Para el muestreo se siguieron los protocolos descritos por Elizalde Velázquez *et al.*, (2021a); Elizalde Velázquez *et al.*, (2021b). Brevemente, para la prueba de embriotoxicidad, recolectamos 140 µL de agua de cada uno de los pocillos de las tres placas de cada concentración. En consecuencia, recolectamos 10 mL de agua de cada concentración. En

cuanto al estudio de estrés oxidativo, se tomaron 10 mL de agua de cada sistema. Se recolectaron muestras de agua para ambos experimentos a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 hpf.

Para el análisis de muestras de agua, utilizamos un sistema HPLC Agilent 1260 acoplado a un API 5500 Qtrap MS equipado con una fuente de pulverización Turbo V Ion. Logramos la separación usando una columna Gemini C18 y una fase móvil de 70 agua:30 acetonitrilo (v/v). El caudal se mantuvo a 1 ml/min y el volumen de inyección fue de 20 µl. Los estándares de calibración y las muestras de control de calidad se prepararon agregando agua ultrapura con FCZ a una concentración que oscilaba entre 0 y 1100 ng/L. La precisión del método propuesto se confirmó agregando agua ultrapura con FCZ en tres niveles diferentes: 80 %, 100 % y 120 %

## 7.8. Prueba de validez y análisis estadístico

Para asegurar la validez y confiabilidad de los resultados, los lotes de huevos solo se usaron si la tasa de viabilidad es  $\geq 90\%$ . Es importante mencionar que la prueba se consideró válida si los controles no muestrearon más del 10% de los efectos teratogénicos a 96 hpf.

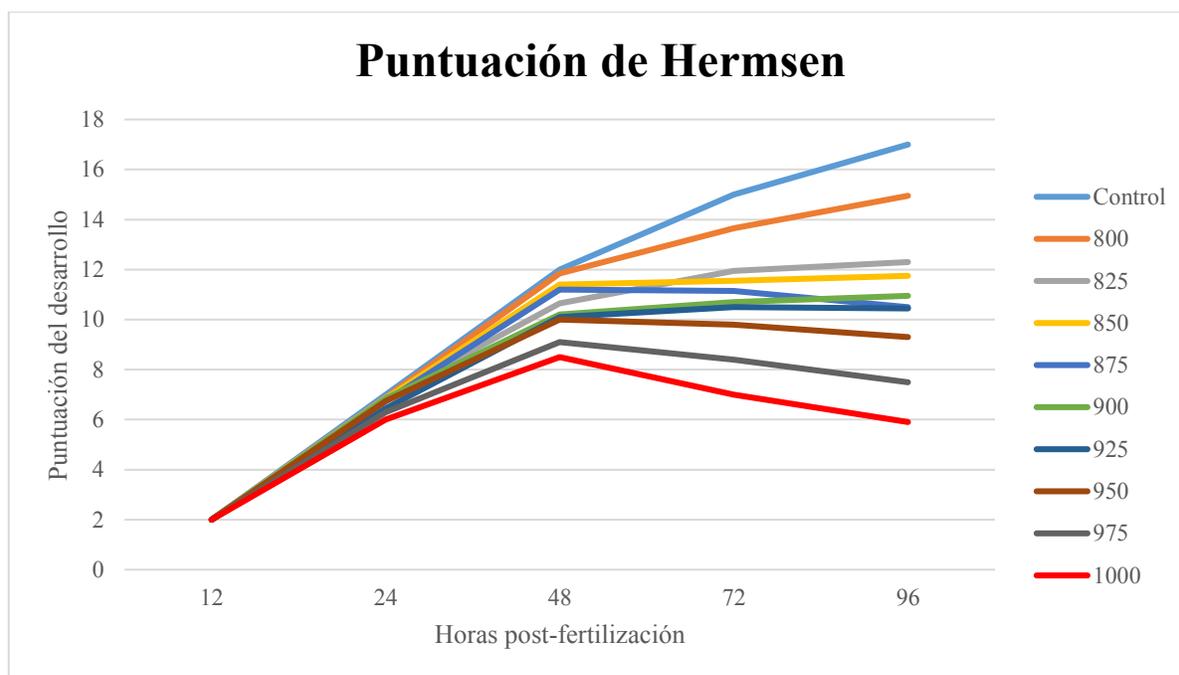
Evaluamos la puntuación de Hermsen, la tasa de eclosión y los resultados del estrés oxidativo con un análisis de varianza bidireccional (ANOVA) seguido de una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Para ello, se consideró el tiempo como Factor A y la concentración como Factor B y se utilizó el software Sigma Plot 12.3. En el caso de embriones sanos, muertos y malformados, además de la expresión génica, realizamos un ANOVA de una vía.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1. Puntuación de Hermsen

En general, la puntuación de Hermsen de los peces expuestos a FCZ disminuyó de forma dependiente de la concentración en comparación con el grupo de control [F (9100) = 1241,359; P < 0,001; n = 3]. No obstante, a la concentración de 875 ng/L, encontramos una

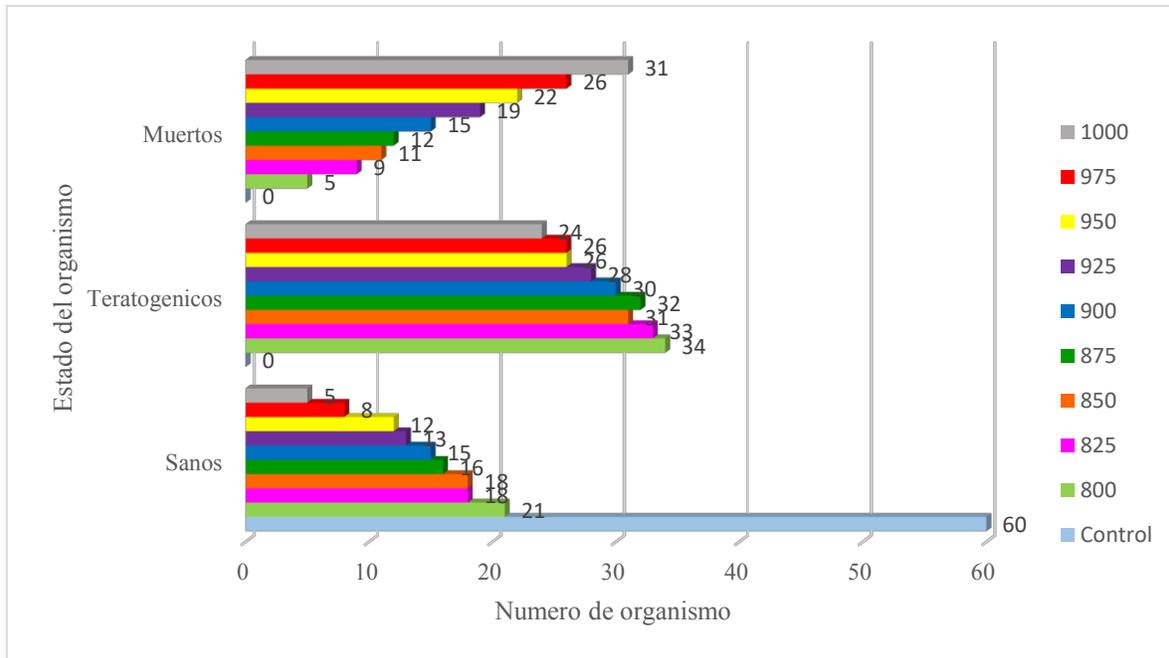
puntuación igual a la observada en peces expuestos a 925 ng/L (Figura 9). Además, no encontramos diferencias significativas entre las concentraciones de 825 a 925 ng/L. El grupo control no mostró ningún retraso significativo en el desarrollo de los peces, alcanzando la puntuación más alta de Hermesen.



**Figura 9:** Puntuación de Hermesen de embriones expuestos a FCZ. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \*Todas las concentraciones de FCZ fueron significativamente diferentes del grupo de control ( $P < 0,05$ ).

## 8.2. Tasa de embriones muertos y malformados

La Figura 10 muestra el porcentaje de embriones sanos, muertos y malformados expuestos a FCZ. Al igual que con la puntuación de Hermesen, observamos una disminución significativa en el número de embriones sanos en comparación con el grupo control [sanos:  $F(9,20) = 65,935$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 3$ ; muerto:  $F(9,20) = 35,988$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 3$ , y mal formado:  $F(9,20) = 27,580$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 3$ ]. Así, encontramos el mayor porcentaje de embriones sanos en el grupo control y el menor en la concentración de 1000 ng/L. Además, también encontramos que el porcentaje de embriones muertos aumentó con la concentración. En cuanto al porcentaje de embriones malformados, no observamos diferencias significativas a concentraciones de 825 a 900 ng/L.



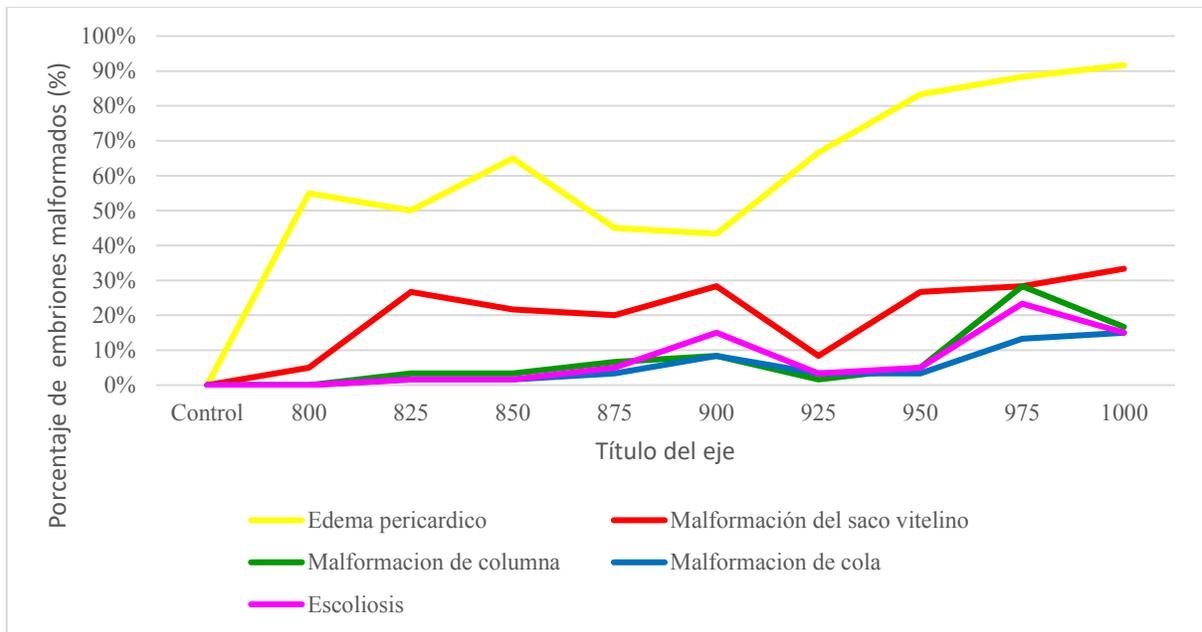
**Figura 10:** Porcentaje de embriones muertos, teratogénicos y sanos expuestos a FCZ. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \*Todas las concentraciones de FCZ fueron significativamente diferentes del grupo de control ( $P < 0,05$ ).

### 8.3. Principales malformaciones inducidas por FCZ

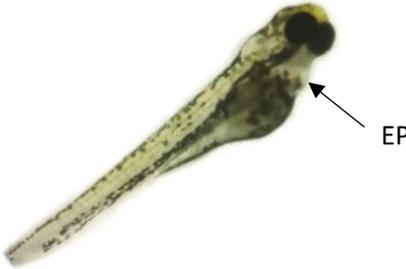
Como se presenta en la Figura 11, los peces del grupo control mostraron un porcentaje mínimo de embriones malformados (4%), y las malformaciones que presentaron solo estaban relacionadas con la hipopigmentación. Por lo tanto, no los consideramos en esta sección. Como se muestra en la Figura 12, los peces expuestos a FCZ mostraron un aumento significativo en la prevalencia de malformaciones en comparación con el grupo de control. Sin embargo, la prevalencia de malformaciones en peces no mostró una tendencia dependiente de la concentración. Por ejemplo, el pescado en algunas concentraciones presentó un aumento en la prevalencia de deformación del saco vitelino, pero en otras una incidencia disminuida

Como se muestra en las Figuras 11 y 12, el edema pericárdico fue la malformación más prevalente en todas las concentraciones de FCZ, seguido de la deformación del saco vitelino.

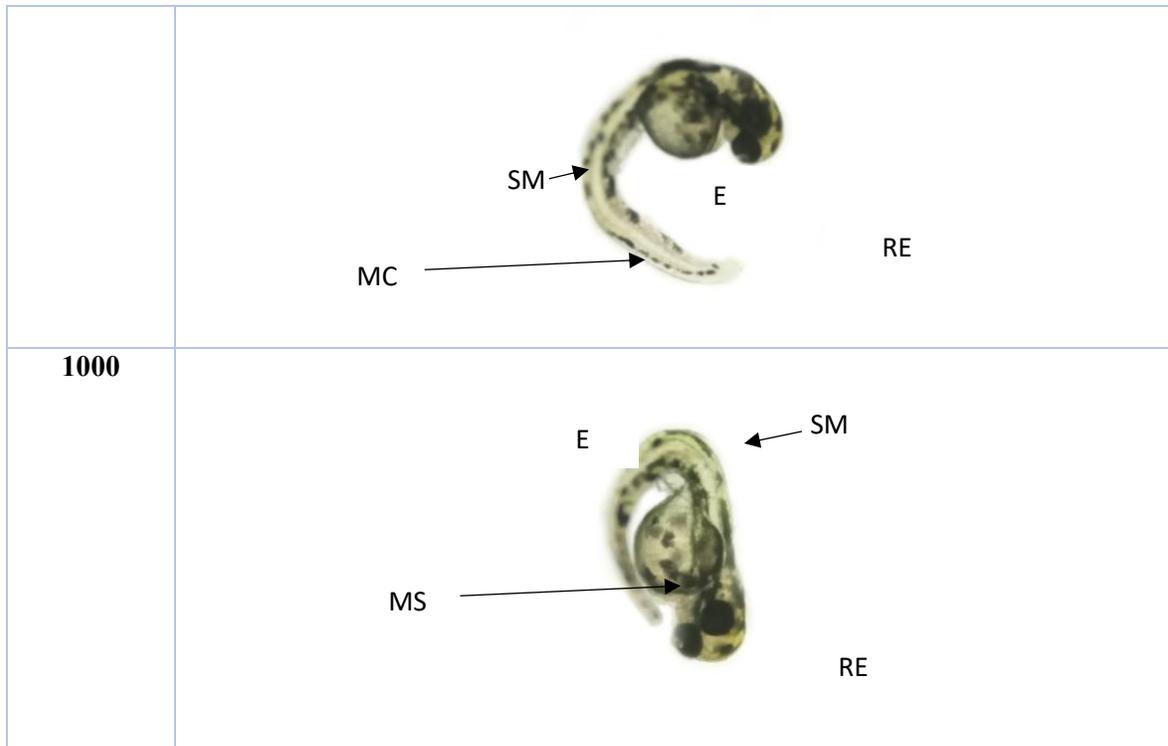
No obstante, en las concentraciones más altas de FCZ, vimos que la prevalencia de escoliosis y deformación de la cola aumentó en comparación con el grupo control.



**Figura 11:** Prevalencia de malformaciones en embriones expuestos a FCZ. Los datos representan la media ± desviación estándar.

[C] (ng L <sup>-1</sup> )	
<b>Control</b>	
<b>800</b>	
<b>850</b>	

875	
900	
925	
950	
975	



**Figura 12:** Principales malformaciones encontradas en embriones expuestos a FCZ. RE: Retraso en la eclosión; EP: edema pericárdico; E: escoliosis; MC: malformación de la cola; MS: malformación del saco vitelino; RD: retraso en el desarrollo.

#### 8.4. Tasa de eclosión

Además de las malformaciones anteriores, los peces expuestos a FCZ mostraron un retraso significativo en el proceso de eclosión a las 72 y 96 hpf en comparación con el grupo de control [ $F(9,40) = 56,988$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 3$ ]. El retraso en el proceso de eclosión dependía de la concentración para ambos puntos de tiempo. Sin embargo, esta alteración fue aún más notable a las 72 hpf en comparación con las 96 hpf (Figura 13). Entre los grupos de tratamiento, cabe señalar que no encontramos diferencias significativas entre las concentraciones de 800 a 875 ng/L. A una concentración de 1000 ng/L, menos del 25 % de los peces eclosionaron a las 72 hpf, mientras que a 96 hpf, solo el 76 % de los peces eclosionaron a la misma concentración.

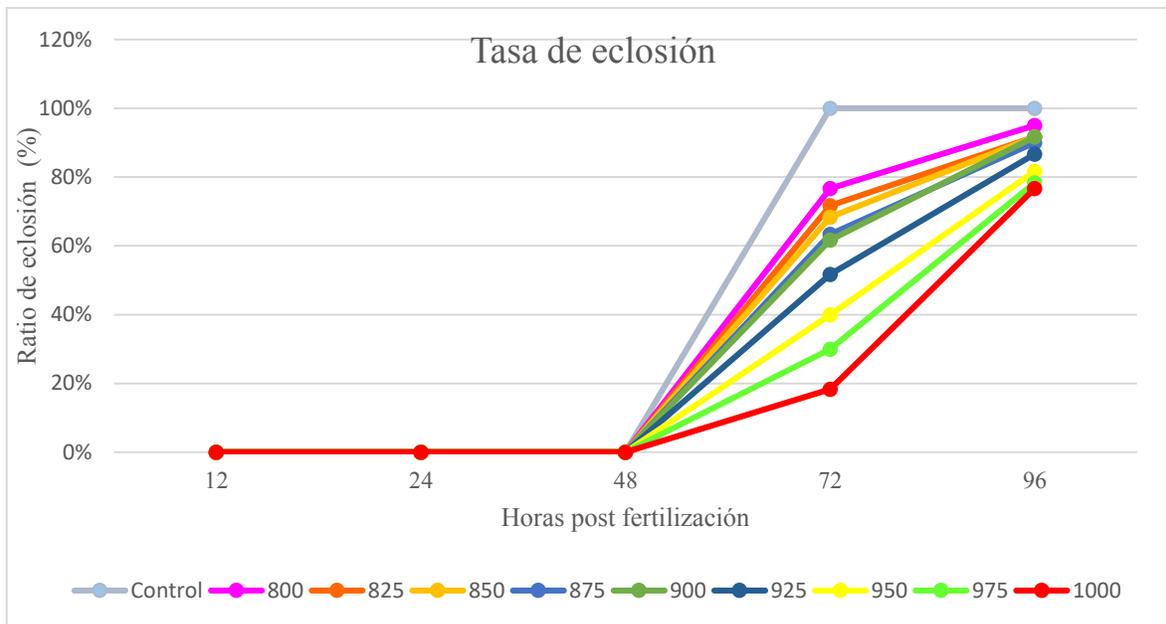
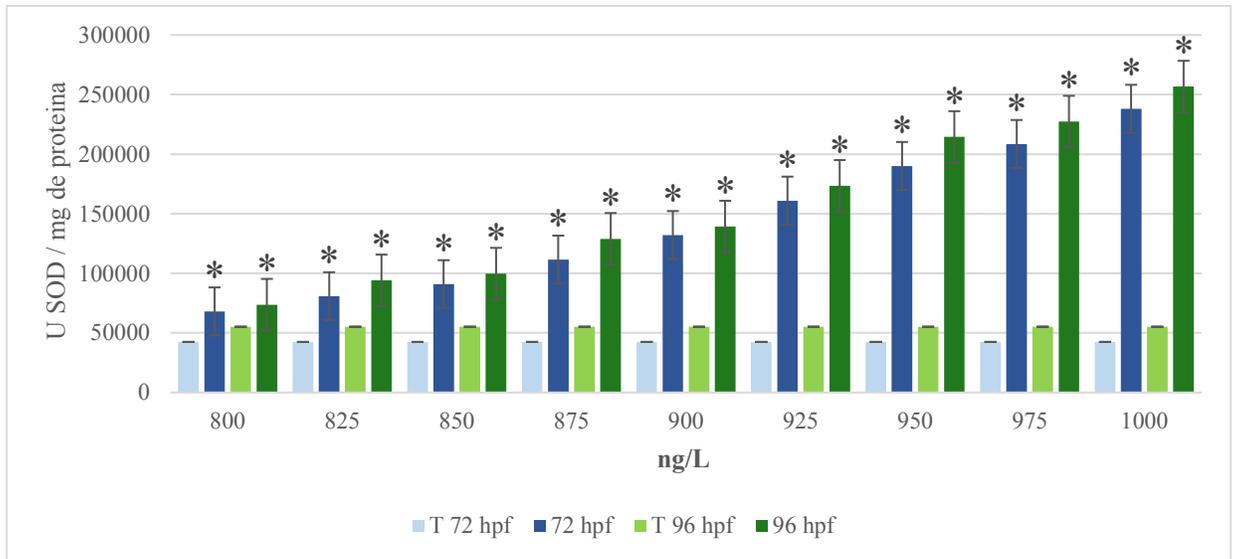


Figura 13: Tasa de eclosión de embriones expuestos a FCZ. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* Indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.

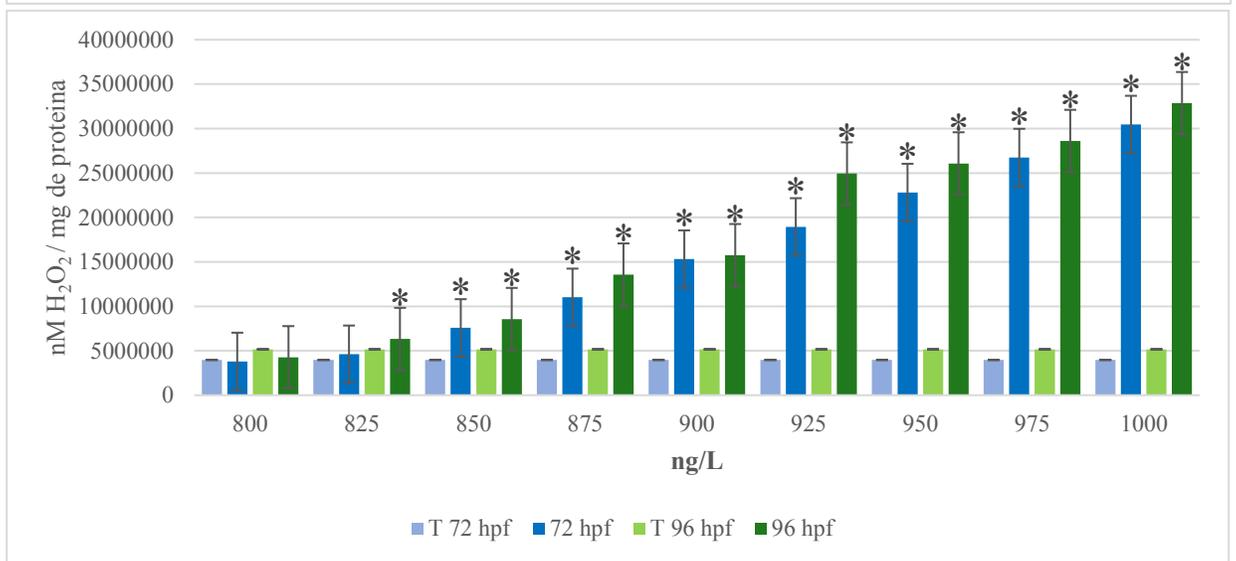
### 8.5. Estrés oxidativo

De acuerdo con nuestros resultados, la actividad enzimática de SOD y CAT en peces expuestos a FCZ aumentó de manera dependiente de la concentración en comparación con el grupo control [SOD:  $F(9,40) = 54.821$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 3$  y CAT:  $F(9,40) = 50,763$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 3$ ]. Así, encontramos diferencias significativas entre todos los grupos de tratamiento y el grupo control en SOD y CAT, excepto en la concentración más baja (Figura 14). En cuanto a los biomarcadores de daño oxidativo, encontramos que los niveles de LPX, HPX y POX aumentaron con la concentración. Además, al igual que con las enzimas antioxidantes, también encontramos diferencias significativas entre todos los grupos de tratamiento y el grupo control en LPX, HPX y POX, excluyendo la concentración más baja [LPX:  $F(9,40) = 57.560$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 3$ , HPX:  $F(9,40) = 42,927$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 3$ ; varicela:  $F(9,40) = 44,709$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 3$ ]. Para todos los biomarcadores de estrés oxidativo, encontramos diferencias significativas entre 72 y 96 hpf en todas las concentraciones de FCZ.

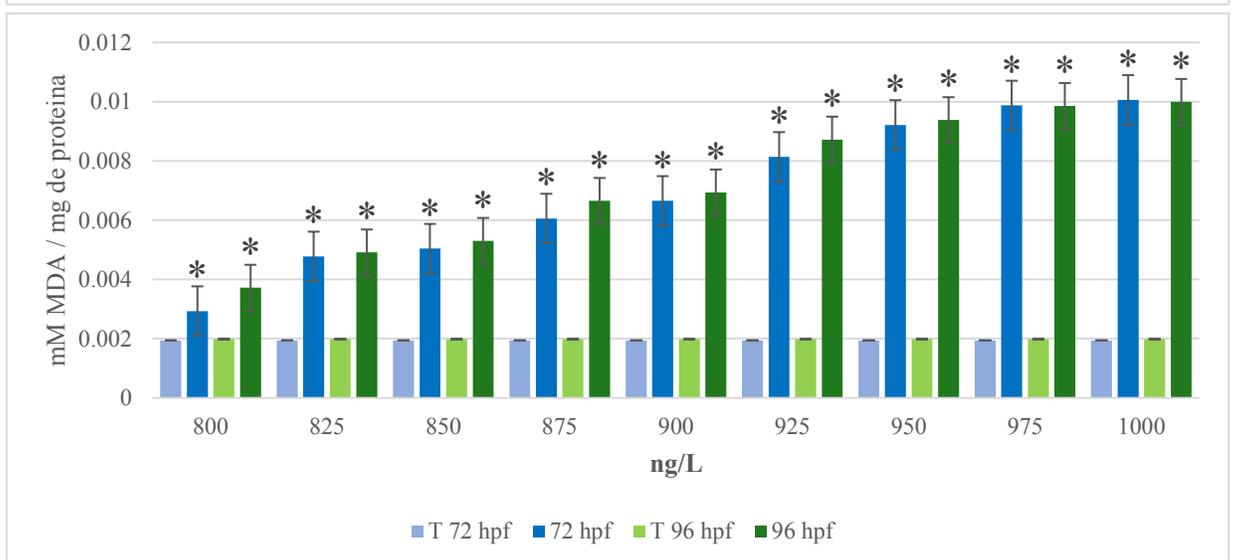
A



B



C



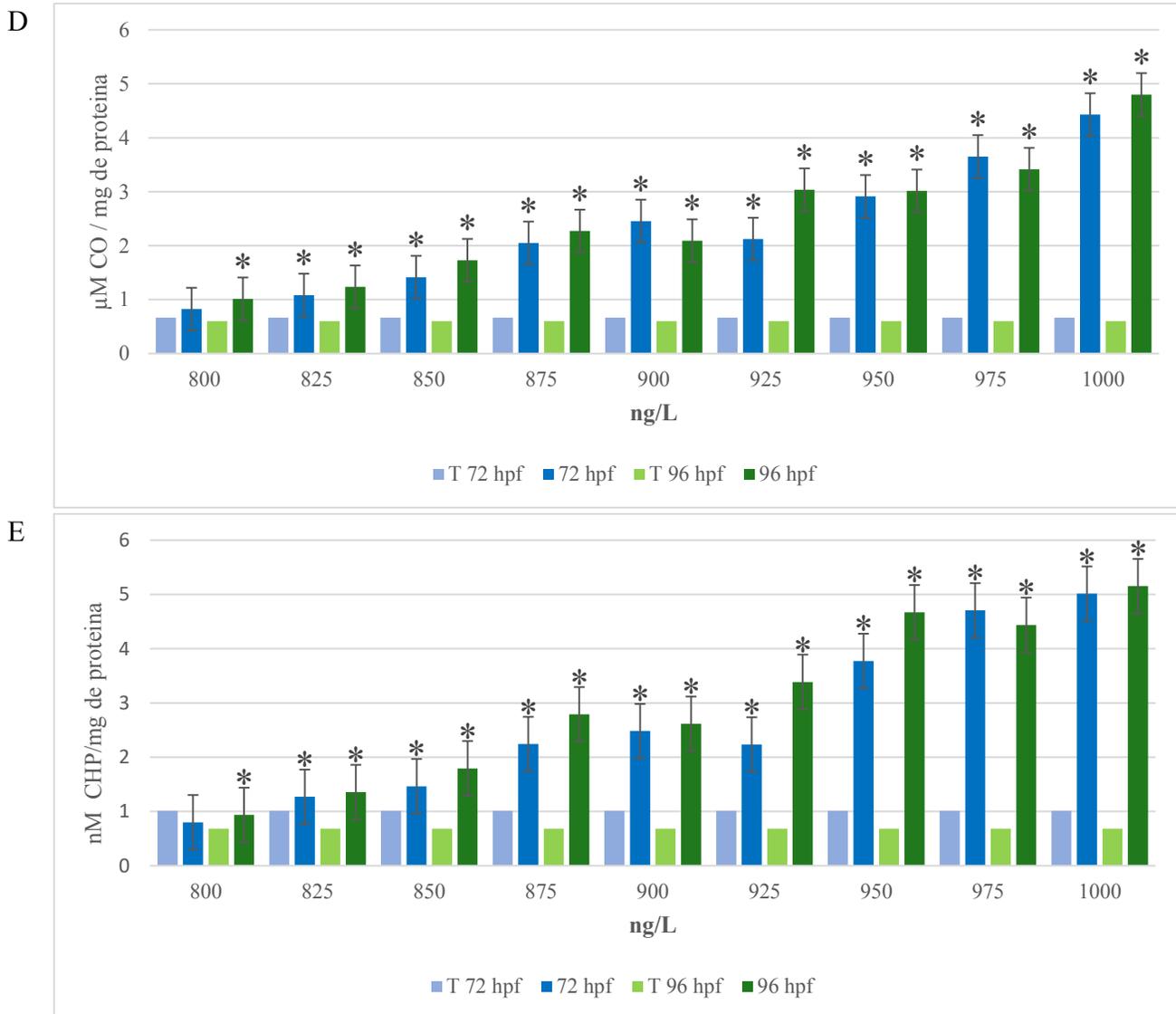
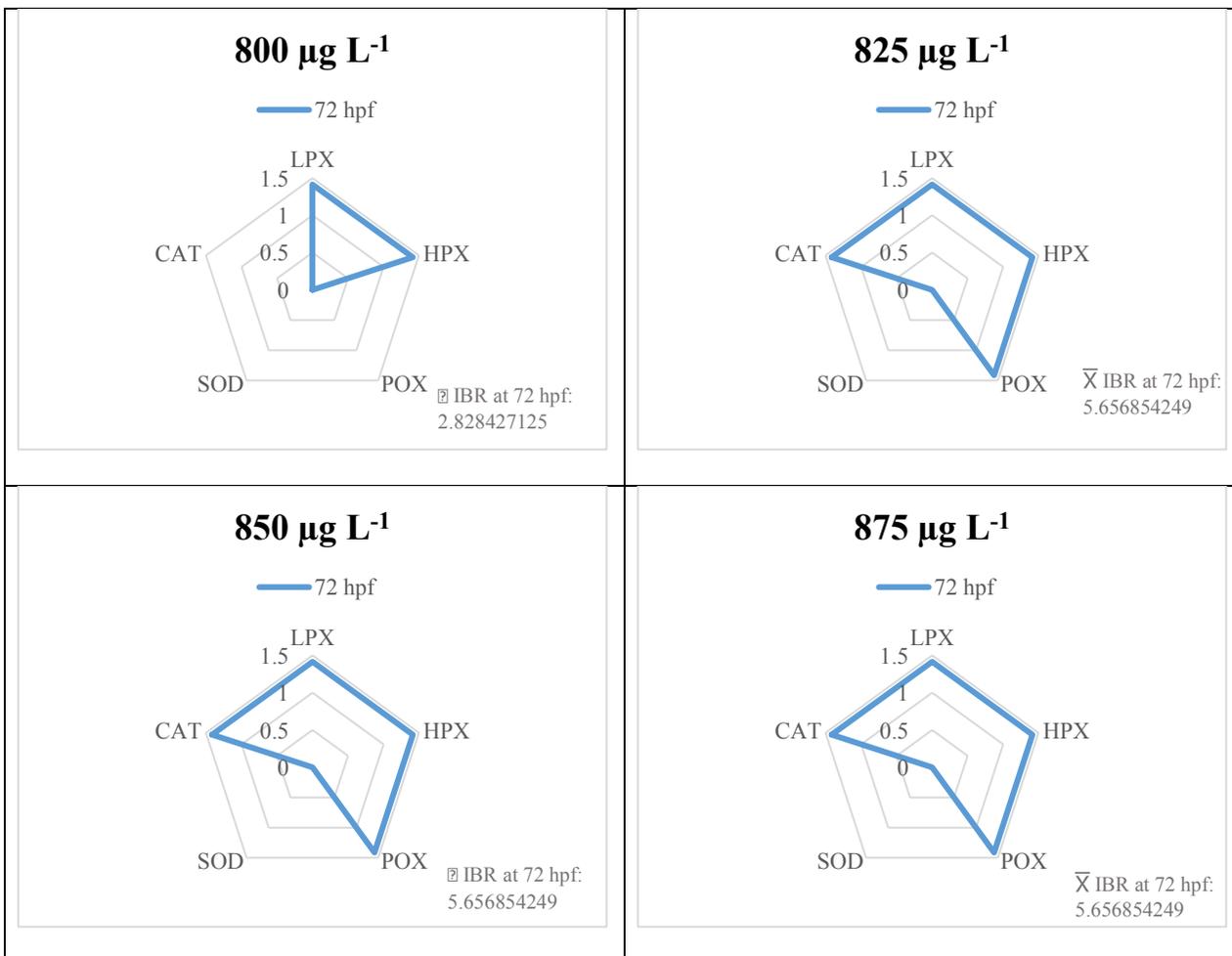


Figura 14: Biomarcadores de estrés oxidativo evaluados en peces expuestos a FCZ: (A) SOD; (B) gato; (C) LPX; (D) viruela; y (E) HPX. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* Indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control. FCZ: fluconazol; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; LPX: lipoperoxidación; POX: carbonilación de proteínas.

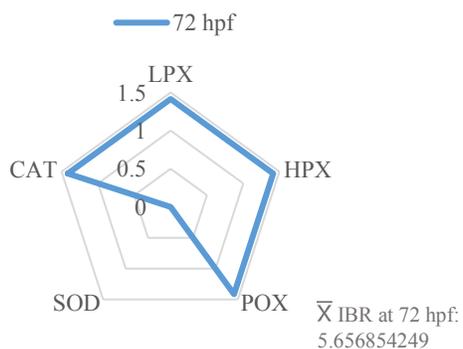
## 8.6. IBR

Dado que los niveles de biomarcadores de daño oxidativo y enzimas antioxidantes en peces expuestos a FCZ aumentaron, realizamos un análisis IBR para determinar su tendencia. En todas las concentraciones de FCZ, los gráficos de estrellas mostraron una tendencia hacia los biomarcadores de daño oxidativo (Figura 15). Además, aunque los valores de IBR

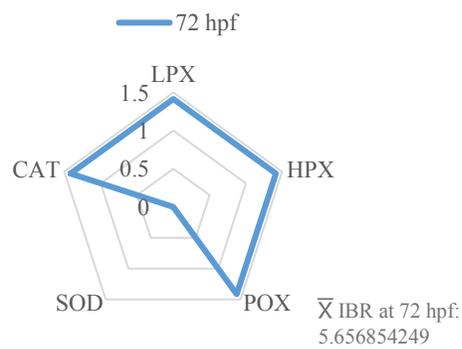
aumentaron de 2,82 a 8,77, no observamos ningún cambio en los valores de IBR entre las concentraciones medias (825-925 ng/L). Además, también observamos una disminución significativa en el valor de IBR de la concentración de 1000 ng/L en comparación con la de 975 ng/L. Curiosamente, no observamos diferencias significativas entre los valores de IBR y las gráficas de estrellas de 72 y 96 hpf.



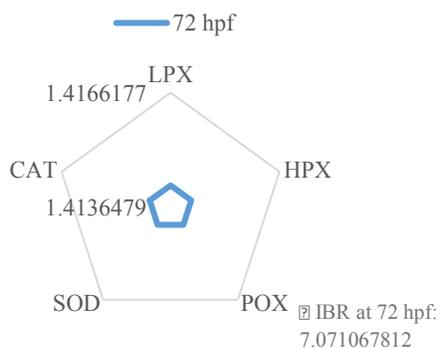
**900  $\mu\text{g L}^{-1}$**



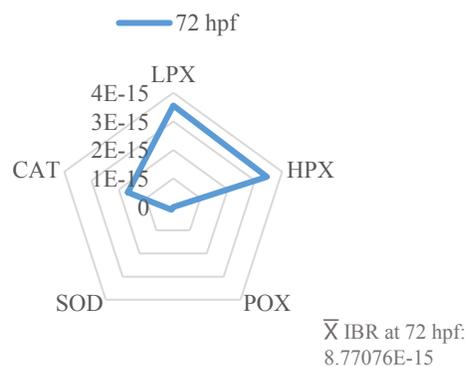
**925  $\mu\text{g L}^{-1}$**



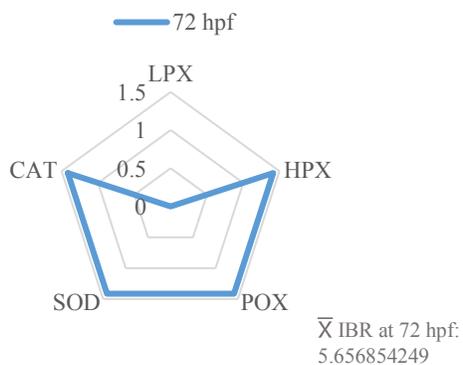
**950  $\mu\text{g L}^{-1}$**



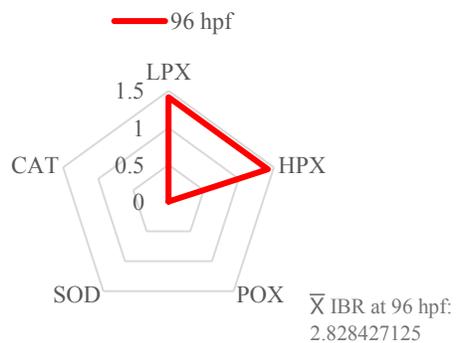
**975  $\mu\text{g L}^{-1}$**



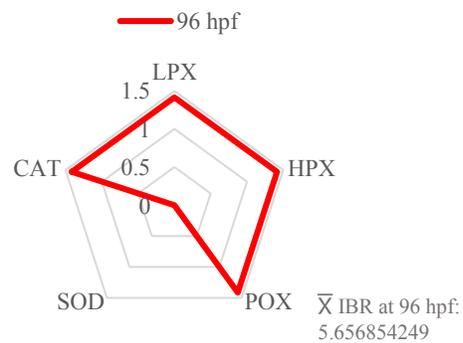
**1000  $\mu\text{g L}^{-1}$**



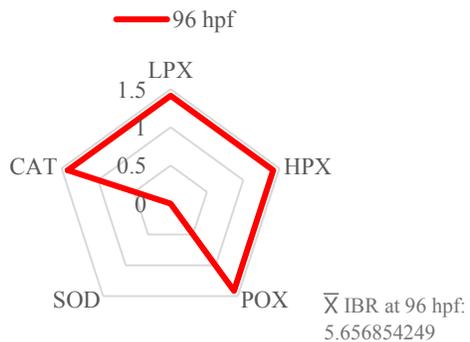
**800  $\mu\text{g L}^{-1}$**



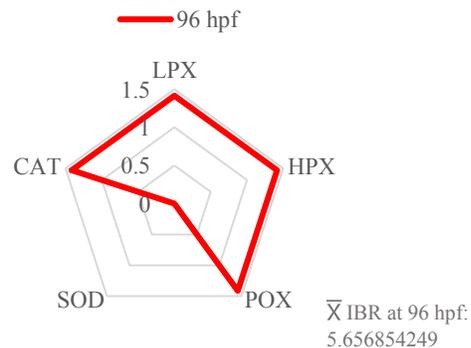
**850  $\mu\text{g L}^{-1}$**



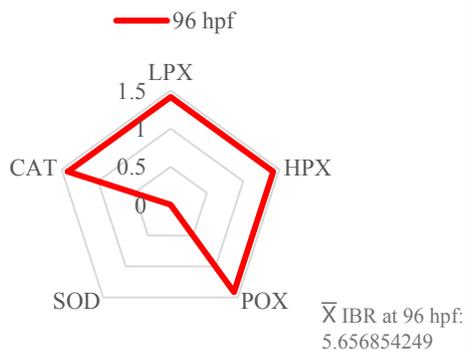
**825  $\mu\text{g L}^{-1}$**



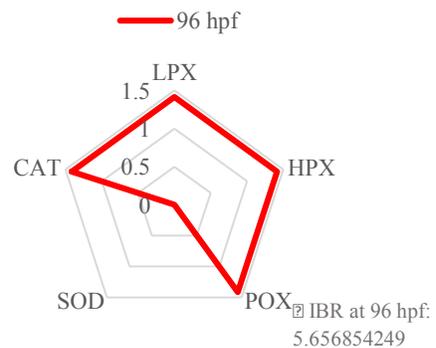
**875  $\mu\text{g L}^{-1}$**



**900  $\mu\text{g L}^{-1}$**



**925  $\mu\text{g L}^{-1}$**



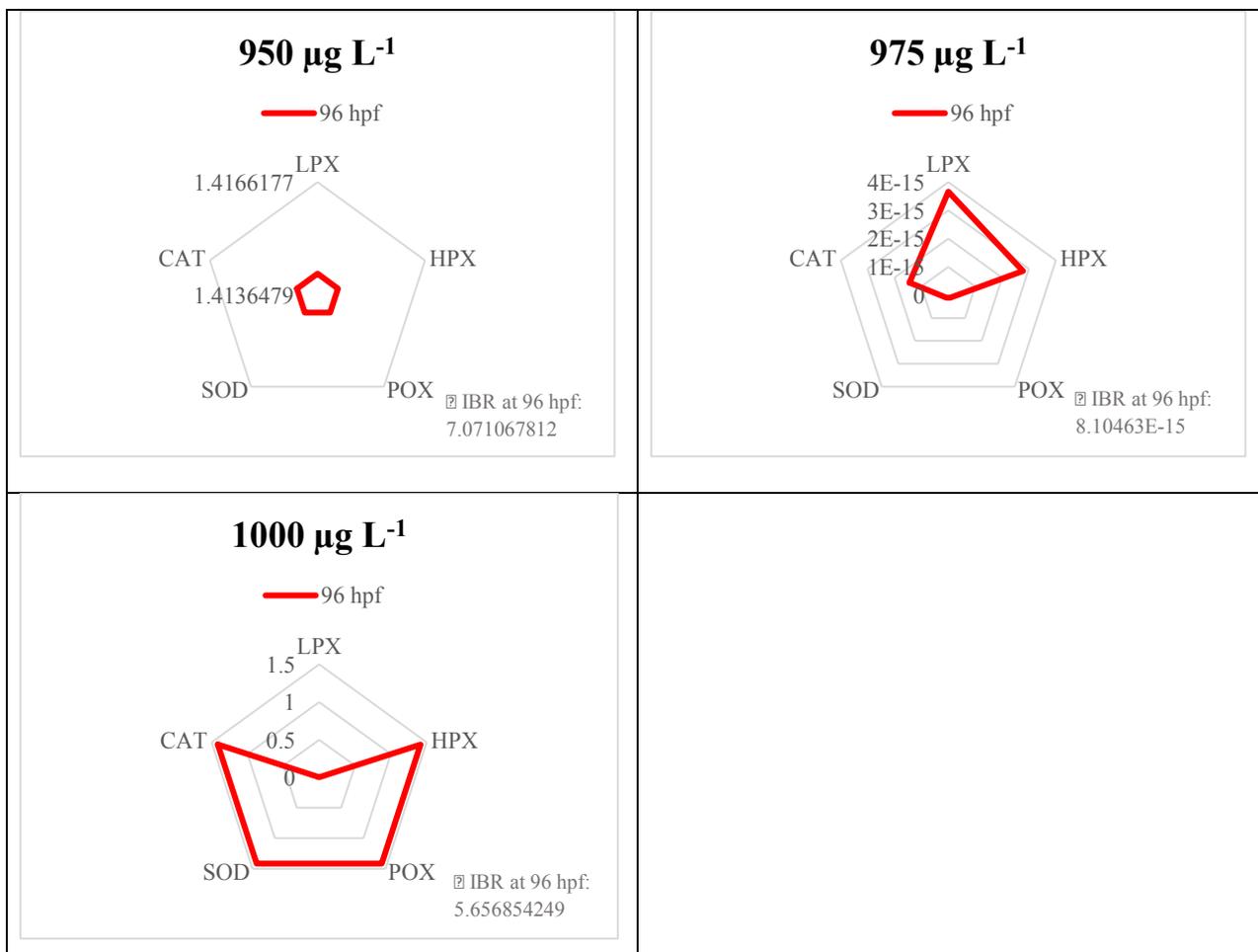
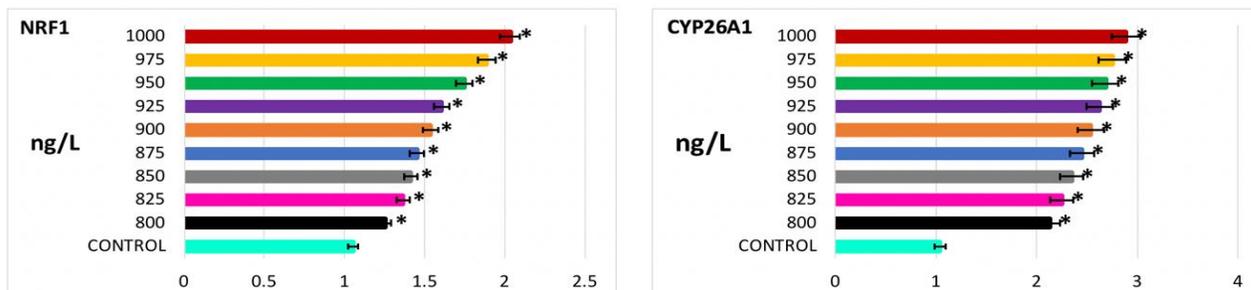


Figura 15: IBR y gráficos de estrellas de biomarcadores de estrés oxidativo. IBR: respuesta integrada de biomarcadores.

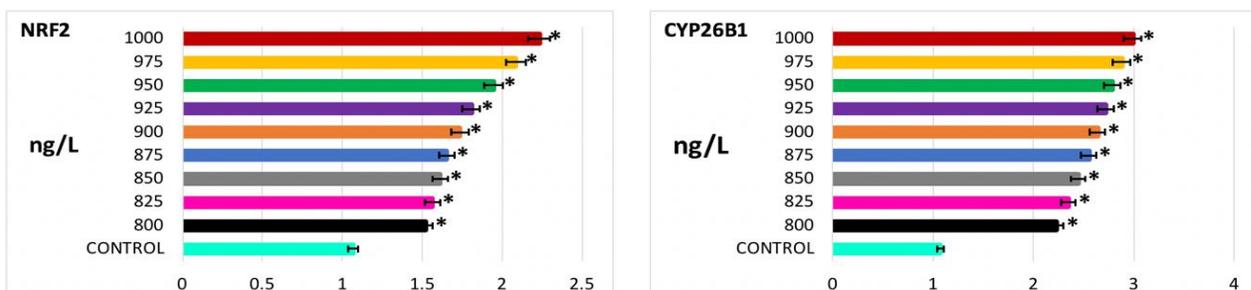
### 8.7. qRT-PCR

La expresión génica de NRF1 y NRF2 aumentó de forma dependiente de la concentración en comparación con el grupo de control [F (9,20) = 320,471; P < 0,001; n = 3]. Además, también observamos que la expresión de CYP26A1 y CYP26B1 aumentaba con la concentración en comparación con el grupo control [F (9,20) = 291,731; P < 0,001; n = 3] [Figura 8] Por lo tanto, encontramos diferencias significativas entre los tratamientos, así como entre los tratamientos y los grupos de control para todos estos genes. En cuanto a los genes WNT3A, WNT8A, NRD1 y NRD2, su expresión disminuyó de forma dependiente de la concentración en comparación con el grupo control, con diferencias significativas entre todos los grupos de

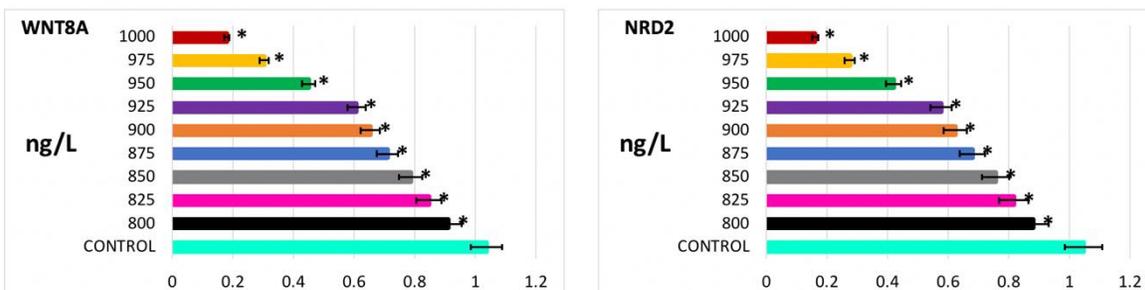
tratamiento [F (9,20) = 345.195; P < 0,001; n = 3; F (9,20) = 301,963; P < 0,001; n = 3]  
 (Figura 16.



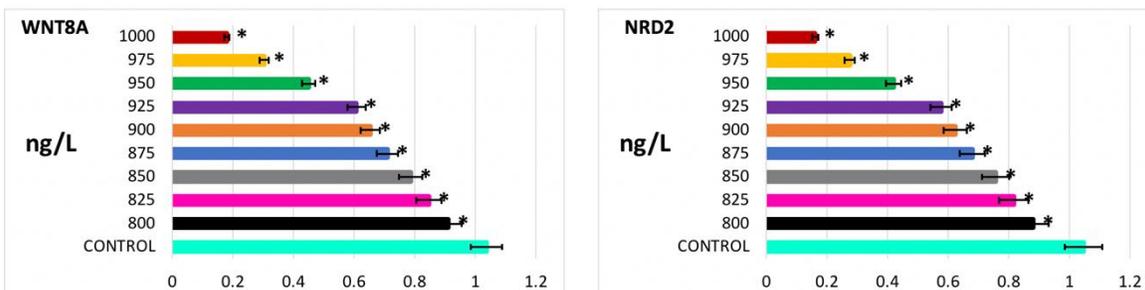
Expresión de genes (cambio de pliegue relativo)



Expresión de genes (cambio de pliegue relativo)



Expresión de genes (cambio de pliegue relativo)



Expresión de genes (cambio de pliegue relativo)

Figura 16: Expresión génica de NRF1, NRF2, CYP26A1, CYP26B1, WNT3A, WNT8A, NRD1 y NRD2 en larvas de *D. rerio* expuestas a FCZ.

## Determinación de FCZ en muestras de agua

Para ambos experimentos, la concentración de FCZ disminuyó después de 96 h de exposición en comparación con la concentración nominal. No obstante, entre los dos experimentos, las concentraciones de FCZ en el experimento de estrés oxidativo disminuyeron más que en la prueba de embriotoxicidad (Tabla 10). En el experimento de estrés oxidativo y la prueba de embriotoxicidad, la concentración de FCZ en el grupo control estuvo por debajo del límite de cuantificación.

Dado que las concentraciones medidas de FCZ no disminuyeron más del 20 % en comparación con la concentración nominal, analizamos todos los resultados en función de esta última.

Aquí, nuestro objetivo fue determinar si FCZ en concentraciones ambientalmente relevantes puede alterar el desarrollo, el estado oxidativo y la expresión génica de NRF1, NRF2, WNT3A, WNT8A, NRD1 y NRD2 de embriones de *D. rerio*. En general, todos los biomarcadores mostraron un aumento o una disminución significativos en comparación con el grupo de control. A continuación, comentamos cada uno de los resultados encontrados en este estudio.

**Tabla 10:** Concentraciones medidas de FCZ en el agua de la prueba de embriotoxicidad y el experimento de estrés oxidativo

Concentración nominal (ng L <sup>-1</sup> )	Prueba de embriotoxicidad de concentración medida (ng L <sup>-1</sup> )	Experimento de estrés oxidativo de concentración medida (ng L <sup>-1</sup> )
Control	< LOQ	< LOQ
800	718.2	703.2
825	734.5	719.1
850	750.6	732.4
875	773.1	754.5
900	801.2	781.3
925	818.9	801.7
950	849.5	820.6
975	863.7	854.3
1000	884.4	870.6

Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar. LOQ: Límite de cuantificación (10 ng/L); LOD: límite de detección (5 ng/L).

Anteriormente, solo un estudio del que tenemos conocimiento evaluó los efectos embriotóxicos de FCZ en peces. En este estudio, los autores señalaron que las malformaciones en los embriones de *Gobiocypris rarus* se vuelven evidentes a 1 mg L<sup>-1</sup> de FCZ; sin embargo, no mencionaron el tipo de malformaciones que presentaban los embriones (Hermesen *et al.*, 2011). A diferencia de este estudio, demostramos que los embriones mostraron la incidencia de edema pericárdico, deformación del saco vitelino, escoliosis y deformación de la cola después de su exposición a bajas concentraciones de FCZ (800-1000 ng L<sup>-1</sup>). En las concentraciones de 825, 875 y 925 ng L<sup>-1</sup>, encontramos prevalencias similares de hipopigmentación y retraso en el desarrollo.

Además, no encontramos diferencias significativas entre las concentraciones de 825 y 925 ng L<sup>-1</sup> porque las malformaciones y el retraso en el desarrollo de los peces fueron similares. Además, también demostramos que FCZ retrasó significativamente el proceso de eclosión de los embriones de *D. rerio*. Las alteraciones en el proceso de eclosión son vitales para los embriones porque una eclosión anticipada puede hacer que los organismos sean más vulnerables a los peligros ambientales, como el estrés mecánico y osmótico y otros contaminantes tóxicos presentes en el agua (Elizalde-Velázquez *et al.*, 2021). Mientras tanto, un retraso en el proceso de eclosión podría hacer que los embriones sean más susceptibles a otros depredadores. Hasta la fecha, los autores han indicado que las alteraciones de la eclosión en los peces pueden ser el resultado de diferentes factores exógenos y endógenos, como la disponibilidad de oxígeno, los moduladores químicos del SNC, los niveles hormonales, la liberación de enzimas proteolíticas y los agentes tóxicos (De la Paz *et al.*, 2017). Como el mecanismo de acción de FCZ está relacionado con la inhibición de la biosíntesis de esteroides y los esteroides son necesarios para la producción de hormonas (Chen *et al.*, 2014; Mahl *et al.*, 2015), creemos que es probable que las alteraciones hormonales inducidas por FCZ sean el mecanismo por el cual este fármaco retrasa el proceso de eclosión. de pescado, No obstante, se necesitan estudios futuros para dilucidar el mecanismo por el cual FCZ inhibe el proceso de eclosión en los peces. De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, Delattin *et al.*, (2019) encontraron que los triazoles triadimefón, triadimenol

y triazol libre (1,2,4-T) inhiben la eclosión del pez cebra al bloquear la función secretora de las células de las glándulas de eclosión. No obstante, encontraron que este proceso fue rescatado por la incubación conjunta con un antagonista del receptor de dopamina D2. Por lo tanto, esta puede ser otra vía por la cual FCZ altera el proceso de eclosión de los peces.

Además de las alteraciones del desarrollo embrionario, FCZ también perjudicó el estado redox de los embriones al aumentar los niveles de SOD, CAT, LPX, POX y HPX. De acuerdo con nuestros resultados, Zhu *et al.*, (2014) demostraron que 0,2 mg L<sup>-1</sup> de FCZ aumentaron significativamente los niveles enzimáticos de SOD y glutatión s-transferasa en embriones de *Gobiocypris rarus*. Además, varios otros estudios han indicado que FCZ indujo ROS en diferentes hongos (Peng *et al.*, 2018; Marotta & Tiboni., 2010). Aunque el mecanismo por el cual FCZ induce el estrés oxidativo en los organismos no se comprende completamente, Uthman *et al.* (2002) sugirió que este proceso está relacionado con la capacidad de FCZ para inhibir la expresión de genes que codifican metalotioneínas (MT). Los MT pueden controlar la producción de ROS a través de la capacidad de enlace de cobre y mediante la donación de electrones (Ruttkay-Nedecky., 2013) Sin embargo, Peng *et al.*, (2018) indicó que FCZ no afectó la expresión génica de MT y MT2 en *Cryptococcus neoformans*. A diferencia del mecanismo anterior, creemos que el estrés oxidativo inducido por FCZ en los peces probablemente se deba a su capacidad de inhibición de la biosíntesis de esteroides. Aquí, demostramos que FCZ regulaba al alza la expresión del miembro 1 de la subfamilia A de la familia 26 del citocromo P450 (CYP26A1) y el miembro 1 de la subfamilia B de la familia 26 del citocromo P450 (CYP26B1) en embriones, lo que podría ser una respuesta de los peces contra la inhibición de la biosíntesis de esteroides FCZ (del Corral., 2003). Los esteroides juegan un papel vital en la estabilización de la membrana plasmática; sin embargo, hallazgos previos demuestran que esto también es vital para la función mitocondrial y la tolerancia al estrés. Por lo tanto, la inhibición de esteroides puede afectar la función de las mitocondrias causando el agotamiento de ATP y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además de la regulación a la baja de MT y MT2, también demostramos que FCZ regulaba al alza la expresión de NRF1 y NRF2, que puede activarse por el aumento de la producción de ROS. Gureev *et al.* (2019), por ejemplo, señalaron que las ROS, en particular el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, son potentes activadores de Nrf2. La capacidad de montar una respuesta eficiente contra la amenaza continua que plantean los oxidantes exógenos como FCZ es esencial para la

supervivencia y la homeostasis celular. El estrés oxidativo activa la transcripción de una variedad de genes antioxidantes a través de una secuencia que actúa en cis conocida como elemento de respuesta antioxidante (ARE). Se han identificado miembros de la familia de factores de transcripción Cap-N-Collar que se unen a ARE, incluidos Nrf1 y Nrf2. Nrf1 y Nrf2 se expresan en una amplia gama de tejidos y tipos de células, y ambos se unen a ARE como heterodímeros con proteínas Maf pequeñas. Tanto Nrf1 como Nrf2 son responsables de regular la expresión de muchos genes antioxidantes, incluida la peroxirredoxina-1 (Prx-1), la tiorredoxina-1 (Txn-1), GCLC (subunidad catalítica de glutamato cisteína ligasa, una enzima responsable de catalizar la formación de glutatión), glutatión peroxidasa (GPX 1), enzimas metabolizadoras de fármacos (citocromo P-450) y varios transportadores de cassette de unión a ATP (ABC) que son responsables de la salida de fármacos. Todos estos genes son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis oxidativa (Schultz *et al.*, 2010; Chepelev *et al.*, 2013).

Una vez que FCZ ingresa a la célula, inhibe CYP26, promoviendo la producción de ácido retinoico (AR), que en exceso induce la regulación positiva de CYP26A1 y CYP26B1 para asegurar la homeostasis de AR (Glover *et al.*, 2006). La AR es esencial en el desarrollo embrionario, ya que los organismos la necesitan para el desarrollo de la médula espinal, las somitas y el ojo (Das *et al.*, 2014; Steinhart *et al.*, 2007)

No obstante, cuando la AR supera los niveles normales, puede causar muchos de los mismos defectos del desarrollo embrionario que se observan con la deficiencia de vitamina A (Bennett *et al.*, 2007). RA no funciona solo en el control del desarrollo de los embriones; interactúa con otras vías de señalización como WNT, factor de diferenciación de crecimiento nodal (NODAL), factor de crecimiento de fibroblastos, erizo sónico y proteína morfogenética ósea. Nuestros resultados demuestran que FCZ reguló a la baja, de manera dependiente de la concentración, la expresión génica de WNT3A, WNT8A, NRD1 y NRD2 en embriones. Los genes WNT están relacionados con los procesos de organogénesis en las primeras etapas de desarrollo (Colakoglu *et al.*, 2005). Mientras tanto, los genes relacionados con NODAL (NRD) codifican un ligando secretado de la superfamilia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que regula el desarrollo embrionario temprano (Chen *et al.*, 2007) Esta vía teratogénica está en línea con hallazgos previos que demuestran

que la AR redujo la expresión génica de TGF- $\beta$  en embriones de roedores (El Zein *et al.*, 2019). Además, El Zein *et al.*, (2019) señaló que la desregulación del receptor alfa del ácido retinoico conduce a un deterioro de la señalización WNT no canónica, lo que promueve la proliferación celular anormal en ratones. En conjunto, creemos que la embriotoxicidad inducida por FCZ, el estrés oxidativo y la alteración de la expresión génica en los peces son el resultado de las alteraciones en la biosíntesis de esteroides y la vía de señalización de la AR. No obstante, se necesitan estudios futuros para comprender mejor el mecanismo por el cual FCZ aumenta la producción de ROS e interrumpe el desarrollo embrionario en el pez cebra, así como también cómo estos hallazgos afectan el estado físico y la salud de los peces en concentraciones ambientalmente relevantes.

## 9. Conclusiones

FCZ es un fungicida triazol utilizado en múltiples medicamentos y productos de cuidado personal, que debido a su consumo ingresa al medio acuático. Sin embargo, la comunidad científica apenas ha estudiado los efectos nocivos que este fármaco puede suponer para las especies acuáticas. En este estudio, demostramos que concentraciones ambientalmente relevantes de FCZ alteraron el desarrollo embrionario de los peces, produciendo varias malformaciones en ellos. Además, también demostramos que la exposición aguda a FCZ afectó el estado oxidativo de los peces, promoviendo la producción de LPX, POX y HPX en los embriones.

## 10. Referencias

- \_\_\_\_\_ (2017); “*The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource*”; UNESCO; París; información obtenida de: [www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/water/wwap/wwdr/2017-wastewater-the-untapped-resource/](http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/water/wwap/wwdr/2017-wastewater-the-untapped-resource/).
- \_\_\_\_\_ (2021); “*Naciones Unidas, Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos*”; El valor del agua. UNESCO, París

- Alastruey-Izquierdo, A., Melhem, M.S., Bonfietti, L.X., Rodriguez-Tudela, J.L.; (2015); “*Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology.*”; Rev Inst Med Trop Sao Paulo; Suppl 19:57-64. doi: 10.1590/S0036-46652015000700011.
- Alloway, B.J., Ayres, D.C.; (1993); “*Chemical Principles of Environmental Pollution*”; Blackie Academic & Professional, London.
- Angeles, L. F., Islam, S., Aldstadt, J., Saqeeb, K. N., Alam, M., Khan, M. A., Aga, D. S.; (2019); “*Retrospective suspect screening reveals previously ignored antibiotics, antifungal compounds, and metabolites in Bangladesh surface waters.*”; Science of The Total Environment, 136285. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.1362.
- Arman, N.Z.; Salmiati, S.; Aris, A.; Salim, M.R.; Nazifa, T.H.; Muhamad, M.S.; Marpongahtun, M. (2021); “*A Review on Emerging Pollutants in the Water Environment: Existences*”; Health Effects and Treatment Processes. Water 2021, 13, 3258. <https://doi.org/10.3390/w13223258>
- Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., & Mayden, R. L. (2013); “*Natural History of Zebrafish (Danio rerio) in India. Zebrafish.*”; 10(1), 1–14. doi:10.1089/zeb.2012.0803
- Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., & Mayden, R. L. (2013); “*Natural History of Zebrafish (Danio rerio) in India.*”; Zebrafish, 10(1), 1–14. doi:10.1089/zeb.2012.0803
- Assress, H. A., Nyoni, H., Mamba, B. B & Msagati, T. A. M.; (2019); “*Target quantification of azole antifungals and retrospective screening of other emerging pollutants in wastewater effluent using UHPLC–QTOF-MS*”; Environmental Pollution; 253, 655–666; doi: 10.1016/j.envpol.2019.07.075.
- Assress, H. A., Nyoni, H., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. M.; (2020); “*Occurrence and risk assessment of azole antifungal drugs in water and wastewater*”; Ecotoxicology and Environmental Safety; 187, 109868; doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109868.
- Ayala, N; (2014); “*Estudio comparativo de los efectos de los anestésicos metanosulfonato de tricaina (MS-222) y eugenol, para su uso en el pez cebra (Danio*

*erio) como modelo experimental (Tesis doctoral)*”; Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

- Bennett, J. T., Joubin, K., Cheng, S. (2007); “*Nodal signaling activates differentiation genes during zebrafish gastrulation.*”; Dev Biol; 304:525-40. DOI PubMed PMC
- Buege, J. A., Aust, S. D. [30]; (1978); “*Microsomal lipid peroxidation.*”; In: Fleischer S, Packer L, editors. Biomembranes - Part C: biological oxidations. Elsevier; p. 302-10.
- Cardona, D. M. O., & Mantilla, J. F. G. (2008); “*Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales.*”; Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 55(2), 115-126.
- Carvalho, I. T., & Santos, L; (2016).; “*Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario.*”; Environment International; 94, 736–757. doi:10.1016/j.envint.2016.06.025.
- Carvalho, I. T., Santos L; (2016); “*Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario.*” Environ. I; doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025.
- Casado, J., Rodríguez, I., Ramil, M., Cela R.; (2014); “*Selective determination of antimycotic drugs in environmental water samples by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry*”; J. Chromatogr; A 1339, 42–49; doi: 10.1016/j.chroma.2014.02.087.
- Castro G., Casado J., Rodríguez I., Ramil M., Ferradás A & Cela R; (2016); “*Time-of-flight mass spectrometry assessment of fluconazole and climbazole UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradability: kinetics study and transformation products elucidation*”; Water Research; 88, 681e690; doi: 10.1016/j.watres.2015.10.053.
- Catalan M & Montejo J C; (2006); “*Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética*”; Rev Iberoam Micol; 23: 39-49.
- Chen, F., Desai, T. J., Qian, J., Niederreither, K., Lü, J., Cardoso, W. V.; (2007); “*Inhibition of Tgf beta signaling by endogenous retinoic acid is essential for primary lung bud induction.*”; Development 2007;134:2969-79.

- Chen, J. B., Gao, H. W., Zhang, Y. L.; (2014); “*Developmental toxicity of diclofenac and elucidation of gene regulation in zebrafish (Danio rerio).*”; Sci Rep; 4:4841. DOI PubMed PMC
- Chen, Z. F. & Ying, G. G.; (2015); “*Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review*”; Environment International” 84, 142-153; doi: 10.1016/j.envint.2015.07.02.
- Chen, Z. F., Ying, G. G., Jiang, Y. X., Yang, B., Lai, H. J., Liu, Y. S., Pan, C. G., Peng, F. Q.; (2014); “*Photodegradation of the azole fungicide fluconazole in aqueous solution under UV-254: kinetics, mechanistic investigations and toxicity evaluation*”; Water Res. 52, 83–91; doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.092.
- Chepelev, N. L., Zhang, H., Liu, H. (2013). (2013); “*Competition of nuclear factor-erythroid 2 factors related transcription factor isoforms, Nrf1 and Nrf2, in antioxidant enzyme induction.*”; Redox Biol;1:183-9.
- Colakoglu, N., Kukner, A., Oner, J., Sonmez, M. F., Oner, H., Ozan, E.; (2005); “*Effects of high dose retinoic acid on TGF-beta2 expression during pancreatic organogenesis.*”; J Mol Histol; 36:413-8. DOI PubMed
- CONAGUA; (2015); “*Num3ragua México*”; www.conagua.gob.mx.
- CONAGUA; (2017); “*Estadísticas del agua en México*”; información obtenida de: [https://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM\\_2017.pdf](https://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2017.pdf).
- Contero, R & Felicita, O; (2006); “*Utilización de Bioensayos para la Determinación de Contaminación en Agua de Riego en la Cuenca del Río Granobles*”; Redalyc; Revista de Ciencias de la Vida, núm. 4, 2006, pp. 38-42; Universidad Politécnica Salesiana Cuenca, Ecuador.
- Cruz-Esteban, S., Leopoldo Cruz-López, E. M., Valle-Mora, J., Infante-Matha D., Santiesteban-Hernández, A., Gutiérrez Hernández, R., Bello-Mendoza R.; (2014); “*Presencia de anti-inflamatorios no esteroideos en cuerpos de agua superficial de Tapachula, Chiapas, México*». Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales, ”; 7 (2): 105-114; doi. org/10.22201/iingen.0718378xe.2014.7.2.46788.
- Damià Barceló L & López de Alda MJ.; (2018); “*Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*”; Instituto de Investigaciones

Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona); información obtenida de: [https://fnca.eu/phocadownload/P.CIENTIFICO/inf\\_contaminacion.pdf](https://fnca.eu/phocadownload/P.CIENTIFICO/inf_contaminacion.pdf).

- Das, B. C., Thapa, P., Karki, R. (2014); “*Retinoic acid signaling pathways in development and diseases.*”; Bioorg Med Chem; 22:673-83.
- De Assis, D. N., Araújo, R. S., Fuscaldi, L. L., Fernandes, S. O. A., Mosqueira, V. C. F. & Cardoso, V. N.; (2018); “*Biodistribution of free and encapsulated 99mTc-fluconazole in an infection model induced by Candida albicans*”; Biomedicine & Pharmacotherapy; 99, 438–444; doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.021.
- De Assis, D. N., Araújo, R. S., Fuscaldi, L. L., Fernandes, S. O. A., Mosqueira, V. C. F., & Cardoso, V. N.; (2018); “*Biodistribution of free and encapsulated 99m Tc-fluconazole in an infection model induced by Candida albicans.*”; Biomedicine & Pharmacotherapy, 99, 438–444; doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.021.
- De Barros, A. L. C., Schmid, F. F., de Aquino, S. F., Afonso, R. J. de C. F.; (2018); “*Determination of nine pharmaceutical active compounds in surface waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-MS/MS*”; Environmental Science and Pollution Research; 25(20), 19962–19974; doi:10.1007/s11356-018-2123-y.
- de Carvalho, Santana, R., Schiave, L.A., Dos Santos, Quaglio, A.S., de Gaitani, C.M., Martinez, R.; (2017); “*Fluconazole Non-susceptible Cryptococcus neoformans, Relapsing/Refractory Cryptococcosis and Long-term Use of Liposomal Amphotericin B in an AIDS Patient.*”; Mycopathologia;182(9-10):855-861. doi: 10.1007/s11046-017-0165-1.
- De la Paz, J. F., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M. S., Allende, M. L. (2017); “*Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells.*”; Int J Mol Sci;18:710.
- De la Paz, J. F., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M. S., Allende, M. L. (2017); “*Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells.*”; Int J Mol Sci; 18:710.
- De Sá, N. P., de Paula, L. F. J., Lopes, L. F. F., Cruz, L. I. B., Matos, T. T. S., Lino, C. I., de Oliveira, R. B., de Souza, F. E. M., Fuchs, B. B., Mylonakis, E., Johann S.; (2018); “*In vivo and in vitro activity of a bis-arylidene-cyclo-alkanone against*

- fluconazole-susceptible and -resistant isolates of Candida albicans*”; Journal of Global Antimicrobial Resistance; 14, 287–293; doi: 10.1016/j.jgar.2018.04.012.
- del Corral, R. D., Olivera-martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., Storey, K. (2003); “Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension.”; Neuron; 40:65-79.
  - Delattin, N., Cammue, B. P., Thevissen, K. (2014); “*Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms.*”; Future Med Chem; 6:77-90.
  - Díaz, L., & Gómez, L.; (2013); “*Evaluación del estrés oxidativo inducido por el efluente proveniente de una industria farmacéutica en branquias de Cyprius carpio (Tesis de licenciatura)*”; Universidad Autónoma del Estado de México, México.
  - Dorado, C. M., Rugerio, V.C., Rivas, A.S.; (2003); “*Estrés oxidativo y neurodegeneración*”; Rev Fac Med UNAM. 46 (6):229-230
  - DrugBank; (S.F); “*Fluconazol*”; Información obtenida de: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00196>.
  - El Zein, R. M., Soria, A. H., Golib, Dzib, J. F., (2019); “*Retinoic acid receptor  $\alpha$  as a novel contributor to adrenal cortex structure and function through interactions with Wnt and Vegfa signalling.*”; Sci Rep 2019;9:14677.
  - Elfikrie, N.; Ho, Y.; Zaidon, S.; Juahir, H.; Tan, E.; (2020); “*Occurrence of pesticides in surface water, pesticides removal efficiency in drinking water treatment plant and potential health risk to consumers in Tenggi River Basin, Malaysia.*”; Sci. Total Environ; 712, 136540.
  - Elizalde-Velázquez, G. A (b)., Gómez-Oliván, L. M., Islas-Flores, H., Hernández-Navarro M. D., García-Medina, S., Galar-Martínez, M. (2021); “*Oxidative stress as a potential mechanism by which guanylurea disrupts the embryogenesis of Danio rerio.*”; Sci Total Environ;799:149432.
  - Elizalde-Velázquez. G. A (a)., Gómez-Oliván, L.M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., Hernández-Navarro, M. D., Galar-Martínez, M.; (2021); “*Antidiabetic drug metformin disrupts the embryogenesis in zebrafish through an oxidative stress mechanism.*”; Chemosphere; 285:131213.

- Esteban, S., Gorga, M., Petrovic, M., González-Alonso, S., Barceló, D., & Valcárcel, Y.; (2014); “*Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain.*”; Science of The Total Environment, 466-467, 939–951. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.101.
- FDA; (s.f); “*Approved Drug Products: Diflucan (fluconazole).*”; Información obtenida de: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/019949s051lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/019949s051lbl.pdf).
- Flores, J., Armillo J. A., & Mediavilla, A.; (2008); “*Farmacología Humana*”; Editorial M.a.s.s.o.n; 5ta Edición; Barcelona, España, Pag 1301-1316.
- Galar, M.M., Gómez, O.L.M., Amaya, C.A., Razo. E.C., Garcia, M.S. (2010); “*Oxidative stress induced on Cyprinus carpio by contaminants present in the water and sediment of Madín Reservoir*”; J Environ Sci Health A 45(2):155-160.
- Galindo-Miranda, J.M.; Guízar-González, C.; Becerril-Bravo, E.J.; Moeller-Chávez, G.; León-Becerril, E.; Vallejo-Rodríguez, R. (2019); “*Occurrence of Emerging Contaminants in Environmental Surface Waters and Their Analytical Methodology—A Review.*”; Water Sci. Technol. Water Supply; 19, 1871–1884.
- García-Valcárcel, A. I., & Tadeo, J. L.; (2012); “*Influence of moisture on the availability and persistence of clotrimazole and fluconazole in sludge-amended soil;*” Environmental Toxicology and Chemistry, 31(3), 501–507. doi:10.1002/etc.1711.
- Giavini, E., & Menegola, E; (2012); “*Biomarkers of teratogenesis: Suggestions from animal studies*”; Reproductive Toxicology; 34(2), 180–185. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.05.003
- Gil, M. N., & Soto, A. M.; (2012); “*Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos*”; Artículo de revisión; Producción + Limpia; Vol.7, No.2 – 52-73.
- Glover, J. C., Renaud, J. S., Rijli, F.M. (2006); “*Retinoic acid and hindbrain patterning.*”; J Neurobiol; 66:705-25.
- Goodman & Gilman; (2007); “*Las bases terapéuticas de la terapéutica*”; Editorial McGRAW-HILL; 11ma Edición; D.F, México; Pag 1225-1242.
- Gregori-Valdes B. S; (2005); “*Estructura y actividad de los antifúngicos.*”; Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar.

- Gunzler, W., Flohe, L. (1985); *“Handbook of methods for oxygen radical research”*; Boca Raton: CRC Press.
- Gureev, A. P., Shaforostova, E. A., Popov, V. N.; (2019); *“Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 $\alpha$  signaling pathways.”*; Front Genet; 10:435.
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., & Thurston, R. V. (1977); *“Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays.”*; Environmental Science & Technology, 11(7), 714–719. doi:10.1021/es60130a004.
- Hermesen, S. A. B., van den Brandhof, E. J., van der Ven, L. T. M., Piersma, A. H., (2011); *“Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies”*; Toxicol. Vitro; 25, 745–753; doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.005
- Hernández-Quiroz, M., Ruiz-Meza, D., Rojo-Callejas, F., & Ponce-De León, H. C.; (2019); *“Determinación de la Distribución de Contaminantes Emergentes en Agua Intersticial en Sedimentos de Humedal Mediante la Optimización y Validación de un Método Analítico”*; Rev. Int. Contam. Ambie; 35 (2) 407-419.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E; (2005); *“Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity”*; Toxicological Sciences, 86(1), 6–19; doi:10.1093/toxsci/kfi110
- Hollier, L.M., Cox, S.M.; (1995); *“Fluconazole (Diflucan).”*; Infect Dis Obstet Gynecol; 3(6):222-5. doi: 10.1155/S1064744995000676.
- Huang, Q., Wang, Z., Wang, C., Peng, X.; (2013); *“Perfilado quiral de antifúngicos azoles en aguas residuales municipales y ríos receptores del delta del río Pearl, China”*; Investigación en ciencias ambientales y contaminación, 20 (12), 8890–8899; doi: 10.1007 / s11356-013-1862-z.
- Jessup, C.J., Pfaller, M.A., Messer, S.A., Zhang, J., Tumberland, M., Mbidde, E.K., Ghannoum, M.A.; (1998); *“Fluconazole susceptibility testing of Cryptococcus neoformans: comparison of two broth microdilution methods and clinical correlates among isolates from Ugandan AIDS patients.”*; J Clin Microbiol; 36(10):2874-6.

- Jiang, Z., Hunt, J. V., Wolff, S. P. (1992); “Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein.”; *Anal Biochem*; 202:384-9.
- Jurado, A.; Vázquez-Suñé, E.; Pujades, E.; (2017); “*Potential Uses of Pumped Urban Groundwater: A Case Study in Sant Adrià Del Besòs (Spain)*.”; *Hydrogeol. J*; 25, 1745–1758.
- Kahle. M., Buerge, I. J., Hauser, A., Muller, M. D & Poiger, T; (2008); “*Azole fungicides: occurrence and fate in wastewaters and surface Waters*”; *Environ. Sci. Technol.* 42, 7193–7200.
- Katti, P. A., Goundadkar, B. B; (2020); “*Azole pharmaceuticals induce germinal vesicle breakdown (GVBD) in preovulatory oocytes of zebrafish (Danio rerio): an in vitro study*”; *Environmental Science and Pollution Research*; doi:10.1007/s11356-020-10719-x
- Kleywegt, S.; Pileggi, V.; Yang, P.; Hao, C.; Zhao, X.; Rocks, C.; Thach, S.; Cheung, P.; Whitehead, B.; (2011); “*Pharmaceuticals, Hormones and Bisphenol A in Untreated Source and Finished Drinking Water in Ontario, Canada—Occurrence and Treatment Efficiency.*”; *Sci. Total Environ*; 409, 1481–1488.
- Konigsberg, L. W., Herrmann, N. P., Wescott, D. J., & Kimmerle, E. H. (2008); “*Estimation and Evidence in Forensic Anthropology: Age-at-Death.*”; *Journal of Forensic Sciences*, 53(3), 541–557. doi:10.1111/j.1556-4029.2008.00710.x.
- León M; (2015); “*Caracterización físico-química, biológica y ecotoxicológica del agua residual de un hospital de la ciudad de Cuenca (Tesis de maestría)*”. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Levine., R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., Shacter, E. (1994); “*Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In: Packer L, editor. Oxygen radicals in biological systems Part C.* ”; Elsevier; pp. 346-57.
- Lewis, R.E. (2011); “*Current concepts in antifungal pharmacology.*”; *Mayo Clin Proc*; 86(8):805-17; doi: 10.4065/mcp.2011.0247.
- Lin, T.; Yu, S.; Chen, W.; (2016); “*Occurrence, Removal and Risk Assessment of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in an Advanced Drinking*

*Water Treatment Plant (ADWTP) around Taihu Lake in China.*”; Chemosphere; 152, 1–9.

- Linares, C. E., Giacomelli, S. R., Altenhofen, D., Alves, S. H., Morsch, V. M., Schetinger, M. R.; (2013); “*Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in Candida albicans and Candida dubliniensis.*”; Rev Soc Bras Med Trop; 46:752-8.
- Liu, X., Lu, S., Guo, W., Xi, B. & Wang, W.; (2018); “*Antibiotics in the aquatic environments: A review of lakes, China*”; Sci. Total Environ. 627, 1195–1208; doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.01.271.
- Liu, X., Lu, S., Guo, W., Xi, B., & Wang, W. 2018. Antibiotics in the aquatic environments: A review of lakes, China. Science of The Total Environment, 627, 1195–1208. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.2.
- Login, C. C., Bâldea, I., Tipericiu, B., Benedec, D., Vodnar, D. C., Decea, N., & Suci, Ș. (2019); “*A Novel Thiazolyl Schiff Base: Antibacterial and Antifungal Effects and In Vitro Oxidative Stress Modulation on Human Endothelial Cells.*”; Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 1–11. doi:10.1155/2019/1607903
- Luja-Mondragón, M., Gómez-Oliván, L. M., SanJuan-Reyes, N., Islas-Flores, H., Orozco Hernández, J. M., Heredia-García, G., Galar-Martínez, M., & Dublán-García, O.; (2019); “*Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on Cyprinus carpio oocytes.*”; Science of the Total Environment, 660, 751–764; doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.072.
- Mahl, C. D., Behling, C. S., Hackenhaar, F. S., (2015); “*Induction of ROS generation by fluconazole in Candida glabrata: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage.*”; Diagn Microbiol Infect Dis; 82:203-8.
- Malkoske, T., Tang, Y., Xu, W., Yu, S., Wang, H.; (2016); “*A review of the environmental distribution, fate, and control of tetrabromobisphenol A released from sources.*”; Sci. Total Environ. 569–570, 1608–1617; doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.062.
- Mañon-Rossi, W., Garrido, G., Núñez-Sellés, A. J. (2016); “*Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante*”; Journal of Pharmacy & Pharmacognosy

Research, vol. 4, núm. 2, pp. 62-83 Asociación de Académicos de Ciencias Farmacéuticas de Antofagasta Antofagasta, Chile

- Marotta, F., Tiboni, G. M.; (2010); “*Molecular aspects of azoles-induced teratogenesis.*”; Expert Opin Drug Metab Toxicol 2010;6:461-82.
- Mendoza-Patiño, N.; (2008); “*Farmacología Medica*”; Editorial Medica Panamericana; México.
- Meviadilla A., Peralta G & Flores J; (2008), farmacología Humana; 5 edición; ELSEVIER; Pag 1301-1316.
- Miguel P, Allevato AJ, Negroni PR, Galimberti PR.; (2007); “*Antifúngicos ayer, hoy y mañana.*”; Act Terap Dermatol; 30:8-19.
- Misra, H. P., Fridovich, I. (1972); “*The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase.*”; J Biol Chem; 247:3170-5.
- Munthe, J.; Brorström-Lundén, E.; Rahmberg, M.; Posthuma, L.; Altenburger, R.; Brack, W.; Bunke, D.; Engelen, G.; Gawlik, B.M.; van Gils, J.; (2017); “*An Expanded Conceptual Framework for Solution-Focused Management of Chemical Pollution in European Waters.*”; Environ. Sci. Eur; 29, 13.
- Nasrollahi, Z., Yadegari, M.H., Roudbar, Mohammadi. S., Roudbary, M., Hosseini, Poor, M., Nikoomanesh, F., Rajabi, Bazl, M.; (2015); “*Fluconazole Resistance Candida albicans in Females With Recurrent Vaginitis and PirI Overexpression.*”; Jundishapur J Microbiol; 23;8(9):e21468; doi: 10.5812/jjm.21468.
- National Center for Biotechnology Information; (2022); “*PubChem Compound Summary for CID 3365, Fluconazole.*”; Información obtenida de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluconazole>.
- Navarro A; Herrera, J., Marrugo, J., Bayona, J., Morales, L; (2014). “Microcontaminantes orgánicos en los ríos de México: El caso del río Nexapa.”; En M. Ramos y V. Aguilera (editores), Ciencias de la ingeniería y tecnología. Handbook T-IV 49-63). Valle de Santiago: Ecorfan.
- NOM-001; (1996); “*NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-SEMARNAT-1996*”; información obtenida de: <https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3290/1/nom-001-semarnat-1996.pdf>.

- NORMAN.; (2016); “List of emerging substances. Network of Reference Laboratories, Research Centres and related Organisations for Monitoring of Emerging Environmental Substances (NORMAN)”;
- Informacion obtenida de: [www.norman-network.net/?q=node/19](http://www.norman-network.net/?q=node/19).
- OECD; (2012); “*New and emerging water pollutants arising from agriculture, prepared by Alistair B.A. Boxall*”; Paris, Organisation for Economic Co-operation, and Development (OECD) Publishing.
- Pandey, M. R & Guo, H; (2014); “*Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and embryotoxicity of insecticide propoxur using flounder gill (FG) cells and zebrafish embryos*”; *Toxicology in Vitro*; 28(3), 340–353; doi.org/10.1016/j.tiv.2013.11.010.
- Peng, C. A., Gaertner, A. A. E., Henriquez, S. A. (2018); “*Fluconazole induces ROS in Cryptococcus neoformans and contributes to DNA damage in vitro.*”; *PLoS One*; 13: e0208471.
- Peng, X., Huang, Q., Zhang, K., Yu, Y., Wang, C., & Wang, C.; (2012); “*Distribution, behavior and fate of azole antifungals during mechanical, biological, and chemical treatments in sewage treatment plants in China*”; *ELSEVIER; Science of the Total Environment*; doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.067.
- Peng, X., Huang, Q., Zhang, K., Yu, Y., Wang, Z., & Wang, C.; (2012); “*Distribution, behavior, and fate of azole antifungals during mechanical, biological, and chemical treatments in sewage treatment plants in China.*”; *Science of The Total Environment*, 426, 311–317. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.0.
- Pradhan, A., Olsson, P. E.; (2015); “*Inhibition of retinoic acid synthesis disrupts spermatogenesis and fecundity in zebrafish.*”; *Gen Comp Endocrinol*; 217-218:81-91.
- Quintero, A.; (2017); “*Evaluación ecotoxicológica de la carbamazepina y los nonilfenoles en agua (Tesis de maestría)*”; Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Radi, R., Turrens, J., Chang, L., Bush, K., Crapo, J., Freeman, B. (1991); “*Detection of catalase in rat heart mitochondria.*”; *J Biol Chem*; 266:22028-34.
- Reis, E. O., Foureaux, A. F. S., Rodrigues, J. S., Moreira, V. R., Lebron, Y. A. R., Santos, L. V. S., Lange, L. C.; (2019); “*Occurrence, removal and seasonal variation*

*of pharmaceuticals in Brazilian drinking water treatment plants.*”; Environmental Pollution. doi:10.1016/j.envpol.2019.04.102.

- Robledo Zacarías, V. H., Velázquez Machuca, M. A., Montañez Soto, J. L., Pimentel Equihua, J. L., & Vallejo Cardona, A. A.; (2017); “*Hidroquímica y contaminantes emergentes en aguas residuales urbano industriales de morelia, michoacán, méxico*”; Revista Internacional de Contaminación Ambiental; 33(2), 221–235. doi:10.20937/rica.2017.33.02.04.
- Ruiz-Vicente, A., & Moreno-Guillén, S. (2006); “*Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.*”; Ed. Médica Panamericana.
- Ruttkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J. (2013); “*The role of metallothionein in oxidative stress.*”; Int J Mol Sci; 14:6044-66.
- SAGAN. Contaminación del agua. Disponible en:[http://www.sagangea.org/hojared\\_AGUA/paginas/17agua.html](http://www.sagangea.org/hojared_AGUA/paginas/17agua.html) (citado 12/05/2015).
- Sanganyado E, & Kajau, TA; (2022); “*The fate of emerging pollutants in aquatic systems: An overview*”; ReseachGate; Emerging Freshwater Pollutants (pp.119-135); doi: 10.1016/B978-0-12-822850-0.00002-8.
- Sanganyado, E., Lu, Z., Fu, Q., Schlenk, D., Gan, J.; (2017); “*Chiral pharmaceuticals: a review on their environmental occurrence and fate processes.*”; Water Res. 124, 527–542; doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.003.
- Santos, A. V., Couto, C. F., Lebron, Y. A., Moreira, V. R., Foureaux, A. F. S., Reis, E. O., Santos, L. V. S., de Andrade, L. H., Amaral, M. C. S., Lange, L. C.; (2020); “*Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in water supply systems in Brazil*”; Science of The Total Environment, 141011. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.1410.
- Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. B. S. M.; “(2010)”; “*Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*”; Journal of Hazardous Materials, 175(1–3), 45–95; doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100.

- Schaidler, L.A.; Rodgers, K.M.; Rudel, R.A.; (2017); “*Review of Organic Wastewater Compound Concentrations and Removal in Onsite Wastewater Treatment Systems. Environ.*”; Sci. Technol.; 51, 7304–7317.
- Schultz, M. A., Abdel-Mageed, A. B., Mondal D.; (2010); “*The nrf1 and nrf2 balance in oxidative stress regulation and androgen signaling in prostate cancer cells.*”; Cancers (Basel);2:1354-78.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT); (2015); “*Normas Mexicanas*”; Información obtenida de: <https://www.semarnat.gob.mx/gobmx/biblioteca/nmx.html>.
- SEMARNAT.; (2015); “*Informe de la Situación del Medio Ambiente en México*”; Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave, de Desempeño Ambiental y de Crecimiento Verde. Edición 2015. Semarnat. México.
- SEMARNAT; (1996); “*Norma Oficial Mexicana Nom-001-Semarnat1996*”; Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca; México
- Silva J; (2007); “*Estandarización del Bioensayo de Toxicidad Aguda con Diplodon Chilensis Usando un Toxico de Referencia*”; Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Chile; Gayana 71(2): 135-141.
- Simazaki, D.; Kubota, R.; Suzuki, T.; Akiba, M.; Nishimura, T.; Kunikane, S.; (2015); “*Occurrence of Selected Pharmaceuticals at Drinking Water Purification Plants in Japan and Implications for Human Health*”; Water Res; 76, 187–200.
- Singulani J. L., Galeane M. C., Ramos M. D., Gomes P. C., Tavares dos Santos C, Monson de Souza B., Palma M. S., Fusco Almeida A. M & Soares Mendes Giannini M. J.; (2019); “*Antifungal Activity, Toxicity and Membranolytic Action of a Mastoparan Analog Peptide; Front.*”; Cell. Infect. Microbiol. 9:419; doi: 10.3389/fcimb.2019.00419.
- SOBRESOPIO; (2019); “*Día Mundial del Agua*”; Consorcio de Aguas
- Stefanakis, A.I.; Becker, J.A. A; (2015); “*Review of Emerging Contaminants in Water: Classification, Sources, and Potential Risks. In Practice, Progress, and Proficiency in Sustainability*”; IGI Global: Hershey, PA, USA; pp. 55–80.
- Steinhart, Z., Angers, S. (2018); “*Wnt signaling in development and tissue homeostasis.*”; Development; 145:dev146589. DOI PubMed

- Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 2013., OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD; doi.org/10.1787/9789264203709-en.
- Thompson, L & Al-Hasan, Y; (2012); *“Impact of Oxidative Stress in Fetal Programming”*; Journal of Pregnancy; 1-8; doi.org/10.1155/2012/582748.
- U.S. EPA; (2011); *“Exposure Factors Handbook 2011 Edition (Final Report)”*; U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC; EPA/600/R-09/052F, 2011.
- Uthman, A., Rezaie, S., Dockal, M., Ban, J., Söltz-szöts, J., Tschachler, E. (2002); *“Fluconazole downregulates metallothionein expression and increases copper cytotoxicity in Microsporium canis”*; Biochem Biophys Res Commun; 299:688-92.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006); *“Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants”*; Ecotoxicology and environmental safety, 64(2), 178-189.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P.; (2003); *“Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review.”*; Environmental Toxicology and Pharmacology, 13(2), 57–149; doi:10.1016/s1382-6689(02)00126-6.
- Vargas-Vargas, R. A; (2017); *“Pez cebra (Danio rerio) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica”*; Anestesia en México; Volumen 29: (Supl. No.1) 86-96.
- Velázquez-Velázquez E & Vega, M. E; (2004). *“Los peces como indicadores del estado de salud de los ecosistemas acuáticos”*. CONABIO. Biodiversitas 57:12-15.
- Venereo-Gutiérrez, Justo R.; (2002); *“Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes”*; Revista Cubana de Medicina Militar, 31(2), 126-133.
- Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H., (2011); *“Zebrafish (Danio rerio) embryos as a model for testing proteratogens.”*; Toxicology 281, 25–36; doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.004.
- Wells, P. G., McCallum, G. P., Chen C. S., Henderson, J. T., Lee, C. J. J., Perstin, J., Preston, T. J., Wiley, M. J. & Wong, A. W; (2009); *“Oxidative Stress in Developmental Origins of Disease: Teratogenesis, Neurodevelopmental Deficits, and Cancer”* Toxicological Sciences. 108(1): 4–18; doi.org/10.1093/toxsci/kfn263.
- Westlund, P., & Yargeau, V.; (2017); *“Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays”*;

Science of The Total Environment; 607-608, 744–751; doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.032.

- Westlund, P., & Yargeau, V.; (2017); “*Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays.*”; Science of The Total Environment, 607-608, 744–751. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.0.
- Wollam, J., Antebi, A. (2011); “*Sterol regulation of metabolism, homeostasis, and development.*”; Annu Rev Biochem; 80:885-916.
- Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002); “*What is oxidative stress?*”; Japan medical association journal, 45(7), 271-276.
- Zayed, Y., Malik, R., Qi, X., Peng, C.; (2020); “*Nodal regulates ovarian functions in zebrafish.*”; Mol Cell Endocrinol; 511:110821.
- Zhu, B., Liu, L., Gong, Y. X., Ling, F., Wang, G. X.; (2014); “*Triazole-induced toxicity in developing rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos.*”; Environ Sci Pollut Res Int; 21:13625-35.