



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de la toxicidad en adultos y
embriones de pez cebra (*Danio rerio*) inducida por
Difenilhidantoína**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

Presenta:

M. en C. Q. Jesús Daniel Cardoso Vera

Dirigido por:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Dra. Hariz Islas Flores

Dra. Nely San Juan Reyes

Toluca, Estado de México

Mayo, 2022



Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis a toda mi familia. A mis padres Daniel y Esperanza Leticia, por su amor, comprensión y apoyo incondicional siempre. Me han enseñado los valores y principios con los que ahora me guio como persona. Me han dado siempre lo mejor que han podido con mucho amor y sin pedir nada a cambio. Los amo padres.

Para mi amada esposa Rosa Angélica, te dedico esta tesis. Por todo tu amor, paciencia, comprensión, empeño, por ser como eres y porque te amo. Eres la persona que ha visto directamente el esfuerzo y trabajo que he dedicado a la realización de este trabajo. Tú has sido un pilar muy importante para que haya podido concluir esta etapa en mi vida profesional. No tengo palabras para agradecer todo el amor y apoyo que siempre me das. Para mi hija, Tania Itzayana, mi regalo de Dios. Eres quien me da la motivación y la fuerza para siempre salir adelante. Las amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Eduardo y Ramón, por estar siempre presentes en todos los momentos de mi vida acompañándome y apoyándome, también son parte fundamental de este logro. Los amo.

Agradecimientos

Agradezco a Dios, desde lo más profundo de mi corazón, por todo el amor, bendiciones y misericordia que derrama en mi vida día con día. Por haberme dado una familia tan maravillosa que me impulsa siempre a dar lo mejor de mí y así superarme constantemente.

Al Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván, gracias por su paciencia, profesionalismo y todo el conocimiento durante la realización de este trabajo, no lo hubiera logrado tan fácil sin su apoyo. Usted ha formado parte importante de toda mi carrera profesional, desde la licenciatura hasta el doctorado, siempre lo he visto como un ejemplo de constancia y dedicación en el área de la investigación. Muchas gracias por las varias pláticas y palabras de aliento, cuando más las necesité. Gracias por su dirección en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Hariz Islas Flores, muchas gracias por su tiempo, consejos, paciencia y conocimientos que a lo largo de mi desarrollo académico y profesional me ha regalado y ha compartido conmigo. Gracias por la confianza y aliento que siempre me ha dado desde que llegué al grupo de investigación. Le tengo un cariño muy especial.

A la Dra. Nely SanJuan Reyes, Dra. María Dolores Hernández Navarro y Dra. Sandra García Medina por su tiempo, consejos y conocimientos durante la realización de este proyecto. Son un ejemplo de profesionalismo, resiliencia y constancia para mí.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Toxicología Ambiental, ya que con su apoyo y dedicación logramos hacer un excelente equipo de trabajo, son parte fundamental de este trabajo.

A la Universidad Autónoma del Estado de México, en especial a la Facultad de Química, mi segundo hogar, por acogerme en sus aulas e instalaciones y permitirme desarrollar académica y profesionalmente. Mi corazón es verde y oro.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado.

A todos, gracias.

Índice

Índice de tablas	6
Índice de figuras	7
Abreviaturas.....	8
Resumen	9
Abstract	11
Introducción	13
Marco teórico.....	17
Contaminación ambiental.....	17
Contaminación del agua	19
Contaminantes emergentes	20
Productos farmacéuticos.....	23
Fármacos antiepilépticos.....	25
Consumo mundial de FAE.....	29
Ocurrencia y distribución espacial de los FAE en los sistemas de agua.....	33
Transporte y destino de los FAE en matrices sólidas	36
Bioacumulación de FAE en especies acuáticas.....	41
Efectos tóxicos de los FAE en especies acuáticas.....	44
Difenilhidantoína (fenitoína).....	50
Danio rerio	58
Estrés oxidativo	59
Neurotoxicidad.....	60
Acetilcolinesterasa	60
Justificación.....	61
Hipótesis	63
Objetivos.....	63
Objetivo general	63
Objetivos específicos.....	63
Materiales y métodos	64
Reactivos	64
Organismos de ensayo y sistemas de exposición	64
Protocolo de exposición en embriones de <i>D.rerio</i>	65
Evaluación del desarrollo embrionario.....	65
Determinación del estrés oxidativo en embriones de <i>D. rerio</i>	65

Evaluación de la oxidación celular.....	66
Ensayos de actividad antioxidante	67
Determinación del contenido total de proteínas	67
Determinación de la fenitoína	68
Respuesta integrada de bioindicadores (IBR)	68
Análisis estadístico.....	69
Evaluación de los parámetros conductuales (Novel Tank Test)	69
Determinación del estrés oxidativo	70
Determinación de niveles de AChE en el cerebro de <i>D. rerio</i>.....	71
Determinación de la PHE en el agua y en el cerebro del pez cebra	71
Análisis estadístico.....	72
<i>Resultados</i>.....	73
Toxicidad en el desarrollo y evaluación embrionaria	73
Determinación del estrés oxidativo en embriones de <i>D. rerio</i>.....	78
Evaluación del daño oxidativo en embriones de <i>D. rerio</i>.....	78
Actividad de enzimas antioxidantes en embriones de <i>D. rerio</i>	81
Determinación de la PHE.....	81
Respuesta integrada de biomarcadores (IBR).....	82
Efectos de la exposición a PHE en los parámetros de comportamiento	83
Biomarcadores de estrés oxidativo en el cerebro del pez cebra	85
Actividad de la AChE	87
Determinación de la PHE en el agua y en el cerebro del pez cebra	87
Correlación de Pearson entre los biomarcadores de estrés oxidativo y los niveles de AChE con los cambios de comportamiento.....	88
<i>Discusión</i>	90
<i>Conclusiones</i>.....	102
<i>Referencias bibliográficas</i>	103
<i>Anexos</i>	141
 Artículos publicados.....	141

Índice de tablas

Tabla 1. Prescripción de FAE en diferentes países alrededor del mundo	30
Tabla 2. FAE en matrices sólidas	38
Tabla 3. Bioconcentración y bioacumulación de antiepilépticos en la biota acuática.....	41
Tabla 4. Efectos tóxicos de los FAE en diversas especies acuáticas	45
Tabla 5. Propiedades químicas y farmacológicas de la fenitoína	51
Tabla 6. Ocurrencia de PHE en diversas matrices acuáticas.....	56
Tabla 7. Principales malformaciones presentes en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de PHE.	75
Tabla 8. Datos de supervivencia, mortalidad y malformaciones en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos a PHE	78
Tabla 9. Determinación de la concentración de PHE en el agua del sistema de exposición.	81
Tabla 10. Concentraciones de PHE en el agua al inicio de la exposición y después de 96 h de exposición, y concentraciones de PHE y factor de bioconcentración (FBC) en cerebros de pez cebra expuestos durante 96 h.....	88

Índice de figuras

Figura 1. Principales fuentes de contaminación.....	18
Figura 2. Representación gráfica de las principales fuentes de origen y ruta de los CE hacia el ambiente.	23
Figura 3. Mecanismos de acción más importantes de los fármacos antiepilépticos.....	29
Figura 4. Distribución espacial de los FAE detectados en masas de agua de todo el mundo	36
Figura 5. Estructura química de la fenitoína.....	53
Figura 8. Frecuencia de las principales malformaciones inducidas por la exposición de embriones de <i>D. rerio</i> a diferentes concentraciones de PHE.....	75
Figura 9. Efectos de la exposición a PHE sobre los biomarcadores de oxidación celular (A) y las actividades antioxidantes de SOD, CAT y GPx (B) en larvas de pez cebra después de 72 y 96 hpf.....	80
Figura 10. Índice integrado de respuestas de biomarcadores para larvas de <i>Danio rerio</i> expuestas a concentraciones ambientalmente relevantes de PHE.	83
Figura 11. Efectos de la PHE en los parámetros de comportamiento evaluados en el pez cebra.	84
Figura 12. Biomarcadores de daño oxidativo en cerebro de pez cebra.	85
Figura 13. Actividad de las enzimas antioxidantes en cerebro de pez cebra.	86
Figura 14. Actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en el cerebro de los peces cebra expuestos durante 96 h a PHE.....	87
Figura 15. Correlación entre los biomarcadores de estrés oxidativo, los niveles de AChE y FBC con los cambios de comportamiento.	89
Figura 16. Potencial mecanismo implicado en la generación de estrés oxidativo y embriotoxicidad inducidos por la PHE en embriones de pez cebra.	96
Figura 17. Posible mecanismo por el que la PHE induce neurotoxicidad en el pez cebra.....	101

Abreviaturas

ACh - Acetilcolina
AChE - Acetilcolinesterasa
CAT- Catalasa
CE – Contaminantes emergentes
CE₅₀ – Concentración efectiva media
CL₅₀ – Concentración letal media
DMSO – Dimetilsulfóxido
EO – Estrés oxidativo
ERO – Especies reactivas de oxígeno
FAE – Fármacos antiepilépticos
FBC – Factor de bioconcentración
GABA- Ácido γ-aminobutírico
Glu – Glutamato
GPx – Glutación peroxidasa
hpf – horas post-fertilización
HPC – Contenido de hidroperóxidos
IBR – Respuesta integrada de biomarcadores
IT – Índice teratogénico
LoQ – Límite de cuantificación
LPX – nivel de lipoperoxidación
MDA - Malondialdehído
OECD – Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
PBS – Buffer de fosfatos
PCC – Contenido de proteínas carboniladas
PF – Productos farmacéuticos
PHE – Fenitoína
PTAR – Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
SNC – Sistema Nervioso Central
SOD – Superóxido dismutasa
TCA – Ácido tricloroacético
TCB – Ácido tiobarbitúrico

Resumen

La fenitoína (PHE) es un fármaco antiepiléptico ampliamente utilizado en la práctica clínica desde hace unos 80 años. Se utiliza principalmente en el tratamiento de las convulsiones tónico-clónicas y parciales. El consumo generalizado de este fármaco en todo el mundo ha hecho que la PHE se introduzca en las masas de agua. Varios estudios han informado de la presencia de fenitoína (PHE) en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, efluentes hospitalarios, aguas superficiales e incluso agua potable. Sin embargo, son escasos los estudios publicados sobre los efectos tóxicos de la PHE a concentraciones ambientalmente relevantes en los organismos acuáticos, lo que motivó el presente estudio en una especie no objetivo como *Danio rerio*. Se evaluó la toxicidad de PHE de 12 a 96 horas después de la fecundación en embriones de *Danio rerio* a concentraciones ambientalmente relevantes (25 a 1500 ngL⁻¹). Tanto en el grupo de control como en el sistema de 0.05% de DMSO, no se observaron malformaciones, todos los embriones se desarrollaron normalmente después de 96 horas. La gravedad y la frecuencia de las malformaciones aumentaron con el incremento de la concentración de PHE en comparación con los embriones del grupo de control. Las malformaciones observadas incluyeron retraso en el desarrollo, hipopigmentación, miscelánea (más de una malformación en el mismo embrión), modificación en la estructura de la corda, malformación de la cola y deformación del saco vitelino. En cuanto a los biomarcadores de estrés oxidativo en los embriones expuestos, se observó un aumento del grado de peroxidación lipídica, de la carbonilación de las proteínas y del contenido de hidróxicos ($p < 0.05$) con respecto al grupo control. Además, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) a bajas concentraciones de exposición, con una disminución de la actividad enzimática a altas concentraciones. Además, se evaluó el efecto de tres concentraciones de PHE, seleccionadas por su relevancia ambiental (25, 282 y 1500 ngL⁻¹), sobre los parámetros de comportamiento,

utilizando la prueba "Novel Tank Test". También se buscó determinar si estas concentraciones de PHE pueden perjudicar la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) y el estado oxidativo en el cerebro de adultos de *Danio rerio*. Las respuestas conductuales sugirieron un efecto ansiolítico en los organismos expuestos a PHE, observado principalmente en los organismos expuestos a 1500 ngL⁻¹, con una disminución significativa de la movilidad de los peces ($p < 0.001$) y un aumento significativo de la actividad en la parte superior del tanque ($p < 0.001$). Además de la alteración del comportamiento, los peces expuestos a PHE también mostraron un aumento significativo de los niveles de peroxidación lipídica, hidroperóxidos y contenido de carbonilo proteico en comparación con el grupo de control ($p < 0.001$). Además, se observó un aumento significativo ($p < 0.001$) de los niveles de AChE en el cerebro de los peces expuestos a 282 y 1500 ngL⁻¹. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la PHE es un teratógeno potencial y puede causar estrés oxidativo en embriones de *Danio rerio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes. A su vez, la fenitoína genera neurotoxicidad en los adultos de pez cebra expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes.

Abstract

Phenytoin (PHE) is an anti-epileptic drug that has been widely used in clinical practice for about 80 years. It is mainly used in the treatment of tonic-clonic and partial seizures. Widespread use of this drug worldwide has led to PHE entering bodies of water. Several studies have reported the presence of phenytoin (PHE) in wastewater treatment plant effluents, hospital effluents, surface water and even drinking water. However, published studies on the toxic effects of PHE at environmentally relevant concentrations in aquatic organisms are scarce, which prompted the present study in a non-target species such as *Danio rerio*. The toxicity of PHE was evaluated 12 to 96 hours post-fertilization in *Danio rerio* embryos at environmentally relevant concentrations (25 to 1500 ngL⁻¹). In both the control group and the 0.05% DMSO system, no malformations were observed, all embryos developed normally after 96 hours. The severity and frequency of malformations increased with increasing PHE concentration compared to embryos in the control group. Malformations observed included developmental delay, hypopigmentation, miscellaneous (more than one malformation in the same embryo), modification of chorda structure, tail malformation and yolk sac deformation. As for the biomarkers of oxidative stress in the exposed embryos, an increase in the degree of lipid peroxidation, protein carbonylation and hydrophilic content ($p < 0.05$) was observed with respect to the control group. In addition, a significant increase ($p < 0.05$) in antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx) was observed at low exposure concentrations, with a decrease in enzyme activity at high concentrations. In addition, the effect of three PHE concentrations, selected for their environmental relevance (25, 282 and 1500 ngL⁻¹), on the behavioral parameters was evaluated using the Novel Tank Test. We also sought to determine whether these PHE concentrations can impair acetylcholinesterase (AChE) activity and oxidative status in the brain of adult *Danio rerio*. Behavioral responses suggested an anxiolytic effect in PHE-exposed organisms, observed mainly in organisms exposed to 1500 ngL⁻¹, with a significant decrease in fish mobility ($p < 0.001$) and a significant

increase in activity at the top of the tank ($p < 0.001$). In addition to altered behavior, PHE-exposed fish also showed a significant increase in the levels of lipid peroxidation, hydroperoxides and protein carbonyl content compared to the control group ($p < 0.001$). In addition, a significant increase ($p < 0.001$) in AChE levels was observed in the brain of fish exposed to 282 and 1500 ngL^{-1} . The results obtained in the present study suggest that PHE is a potential teratogen and may cause oxidative stress in *Danio rerio* embryos exposed to environmentally relevant concentrations. In addition, phenytoin generates neurotoxicity in zebrafish adults exposed to environmentally relevant concentrations.

Introducción

La Liga Internacional contra la Epilepsia define la epilepsia como: "un trastorno del cerebro caracterizado por una predisposición permanente a las crisis epilépticas y las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición" (Beghi, 2020). La prevalencia global de la epilepsia se reporta en 700 por cada 100,000 personas, afectando a más de 70 millones de personas en el mundo (Espinosa-Jovel et al., 2018). El uso profiláctico de fármacos antiepilépticos (FAE) se considera el tratamiento principal de la epilepsia (Dasgupta y Krasowski, 2020).

A diferencia de otros fármacos, los FAE no se clasifican por su mecanismo de acción. A menudo se pueden clasificar según el año en que se desarrollaron e introdujeron (generación). Los FAE de "primera generación" (1912-1978) incluyen la carbamazepina, la etosuximida, el fenobarbital, la primidona, el valproato y la fenitoína (PHE) (Cotterman-Hart, 2015). La PHE es un fármaco ampliamente utilizado en la práctica clínica desde hace unos 80 años para tratar las convulsiones tónico-clónicas y parciales. (Abou-Khalil, 2016; Patocka et al., 2020). La PHE se une al estado inactivado del canal de Na⁺ y prolonga así el periodo refractario neuronal, teniendo un efecto inhibitor altamente selectivo en el área motora de la corteza cerebral. Además, se cree que la fenitoína ejerce su efecto antiepiléptico estabilizando la función de la membrana de las células cerebrales y aumentando los niveles de neurotransmisores inhibidores (serotonina (5-HT) y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el cerebro (Keppel Hesselink, 2017).

Además, la seguridad y la eficacia de la PHE se han evaluado en más de 100 trastornos diferentes (Keppel Hesselink y Kopsky, 2017), desde el trastorno bipolar (Patocka et al., 2020), la curación de heridas (Keppel Hesselink, 2018; Kumar et al, 2020) espasmos bronquiales inducidos por el asma bronquial y la bronquitis asmática crónica (Zhang et al., 2018), dolor neuropático (Hall et al., 2020), antiarrítmico (Zhang et al., 2018), para reducir la migración y la invasión en el cáncer de mama metastásico (Kalaiarasi et al., 2018) y neuritis óptica (Raftopoulos et al., 2016).

En los protocolos convencionales de tratamiento del estado epiléptico, la PHE se considera el fármaco de primera línea cuando el paciente no responde a las benzodiacepinas, aproximadamente el 40-60% de los casos. (Brigo et al., 2018; Li et al., 2020; Mishra et al., 2014; Nalisetty et al., 2020). Aunque en los últimos años se han aprobado nuevos FAE para tratar el estado epiléptico, la PHE sigue siendo el fármaco de primera línea en muchos países, incluida Tailandia (DeMott et al., 2020; Soontornpun et al., 2020). En Estados Unidos, según la encuesta anual del Panel de Gasto Médico realizada por la Agencia para la Investigación y la Calidad de la Atención Sanitaria (AHRQ), la PHE se encuentra entre los 300 principales medicamentos de 2018, ocupando el puesto 269. Según en esta encuesta, las prescripciones en 2018 fueron aproximadamente 1,643,497. (Kane, 2018). Según estos datos, la PHE es ampliamente consumida a nivel mundial, contribuyendo además a introducir este FAE en las masas de agua a través de los vertidos de efluentes municipales, industriales y hospitalarios. La PHE se ha detectado continuamente en aguas residuales (Mijangos et al., 2018), en aguas superficiales (Simazaki et al., 2015), en aguas subterráneas (Huerta-Fontela et al., 2011) e incluso en agua potable (Liu et al., 2019) en concentraciones que van desde 1.3 hasta 2375 ngL⁻¹.

A pesar de su elevado consumo y detección en el medio ambiente, existen escasos estudios sobre el efecto de la PHE en los organismos acuáticos. Hasta la fecha, por ejemplo, se ha reportado que la PHE causó alteraciones adaptativas en las actividades CAT y GST (hígado) en respuesta al estrés oxidativo en *Lepomis gibbosus* en un rango de concentración de 6,25 a 100 µgL⁻¹ (Brandão et al., 2013). Además, en otro estudio, las larvas de pez cebra expuestas a PHE mostraron una disminución significativa de la actividad de locomoción, con un 50% menos de potencia hidrodinámica que el grupo de control (Zhao et al., 2020). De acuerdo con el estudio anterior, PHE disminuyó la actividad locomotora y la trigmotaxis en larvas de pez cebra expuestas a 500 µM, mientras que las larvas expuestas a 20 µM mostraron un aumento de la actividad locomotora (Liu et al., 2016). En el cerebro del pez cebra adulto, se demostró que la PHE tiene una compleja interacción con los sistemas purinérgico y colinérgico, lo que resulta en la hidrólisis de AMP a 500 y 100 µM en un 65 y 64.8%, respectivamente (Siebel et al., 2010).

Recientemente, (Pieróg et al., 2021) han informado de un efecto significativo de tipo ansiolítico tras la administración de 15 y 30 mg kg⁻¹ de PHE en peces cebra adultos.

El estrés oxidativo (EO) está ampliamente implicado en el mecanismo de toxicidad de varios fármacos detectados en los cuerpos de agua, amenazando el equilibrio ecológico de la vida acuática (Almeida et al., 2015; Brandão et al., 2013; Cheng et al., 2020; Oliveira et al., 2017; Orozco-Hernández et al., 2021). En general, los organismos acuáticos tienen un sistema de defensas enzimáticas para protegerse de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, cuando la producción de radicales libres y especies reactivas supera las defensas antioxidantes, se genera un estado de estrés oxidativo (Wu et al., 2017; Yang et al., 2020). Paralelamente, se han descrito cambios en los parámetros conductuales como puntos finales para evaluar los efectos neurotóxicos de fármacos como los FAE. Los estudios de comportamiento son esenciales, ya que están estrechamente relacionados con la aptitud individual y la persistencia de la población, lo que nos permite comprender mejor los impactos ecológicos de los contaminantes en el medio acuático (K. Chen et al., 2021; Cunha et al., 2017). Además, como la PHE es una droga que actúa directamente sobre el sistema nervioso central, es importante evaluar la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE). La AChE desempeña un papel esencial en la homeostasis cerebral; la regulación de los niveles de acetilcolina (ACh) influye en la excitabilidad neuronal y en la liberación de otros neurotransmisores (Bernardo et al., 2019). La AChE ha sido reconocida como un biomarcador central de neurotoxicidad (Métais et al., 2019).

Las ventajas del pez cebrá (*Danio rerio*) como modelo animal incluyen su pequeño tamaño, su relativo bajo costo, su fácil crianza y reproducción, su rápida maduración, su transparencia embrionaria, su genoma fue secuenciado en su totalidad (Collin y Martin, 2017). La morfología de los nervios de *D. rerio* es muy similar a la de otros vertebrados y está conservada evolutivamente. Además, los sistemas de neurotransmisión se conservan entre *D. rerio* y los mamíferos. Estas características hacen posible el uso de *D. rerio* como modelo animal para entender los mecanismos neurotóxicos subyacentes a la exposición a contaminantes ambientales.

Aunque se ha reportado que la PHE causa alteraciones bioquímicas y de comportamiento en el sistema nervioso de algunos organismos acuáticos, estos efectos

se han reportado a concentraciones más altas que las encontradas en diferentes matrices acuáticas.

Por lo tanto, en este trabajo nos propusimos encontrar un mecanismo de toxicidad integral o complementario de la PHE tanto en embriones como en el pez cebra adulto. El presente estudio plantea la hipótesis de que la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de PHE (25 a 1500 ngL⁻¹) puede inducir embriotoxicidad y teratogénesis en los embriones de pez cebra, así como, alteraciones bioquímicas en el cerebro del pez cebra adulto, como el estrés oxidativo y cambios en la actividad de la AChE, alterando el comportamiento del pez cebra.

Marco teórico

Contaminación ambiental

Hay diferentes definiciones de contaminación ambiental, una definición completa puede ser *“la introducción o presencia de sustancias, organismos o formas de energía en ambientes o sustratos a los que no pertenecen o en cantidades superiores a las propias de dichos sustratos, por un tiempo suficiente, y bajo condiciones tales, que esas sustancias interfieren con la salud y la comodidad de las personas, dañan los recursos naturales o alteran el equilibrio ecológico de la zona”* (Albert, 2007). Para poder comprender la contaminación, debemos tener caracterizada la identidad y la naturaleza de los posibles contaminantes. Los contaminantes pueden originarse por diversas actividades de los seres vivos o bien, por procesos naturales, como la disolución del arsénico de las rocas o por el humo resultante de los incendios naturales (Brusseau, Pepper, & Gerba, 2019).

La figura 1 ilustra las principales categorías de contaminantes a los cuales estamos expuestos los seres vivos. Se hace evidente que la mayoría de estos contaminantes son generados directamente por las actividades humanas como la industria, la minería o la agricultura. Además, una gran cantidad de contaminantes son productos químicos, pudiendo aparecer en el ambiente en estado sólido, líquido o gaseoso.



Figura 1. Principales fuentes de contaminación. Modificado de Brusseau et al., 2019.

La mayor parte de las actividades humanas que provocan la degradación de la calidad del ambiente se consideran contaminación. Aunque la contaminación ambiental no es un fenómeno nuevo, es actualmente, el mayor problema mundial al que nos enfrentamos como sociedad y, la principal causa ambiental de morbilidad y mortalidad (Ukaogo, Ewuzie, & Onwuka, 2020). En el año 2015 se formó una Comisión sobre Contaminación y Salud, bajo el patrocinio de The Lancet (revista médica británica). Esta Comisión realizó un trabajo durante un periodo de dos años, publicando sus resultados en octubre de 2017. El principal objetivo de la Comisión era concientizar sobre la magnitud de la contaminación y prevenir las enfermedades relacionadas con ella. La Comisión multidisciplinaria incluía médicos, epidemiólogos, toxicólogos, abogados, analistas políticos, ingenieros y economistas. Los datos obtenidos por la Comisión demuestran que en el año 2015, todas las formas de contaminación fueron la causa de 9 millones de muertes prematuras, las cuales constituyeron el 16% de todas las muertes a nivel mundial (Landrigan, Fuller, Acosta, et al., 2018; Landrigan, Fuller, Hu, et al., 2018).

Se reporta que la contaminación es mayor en los países de ingresos medios y bajos comparada con los desarrollados, las principales causas atribuibles a esta situación son: la pobreza, la escasa legislación, la casi nula aplicación de sanciones y el desconocimiento de las formas de contaminación (Muralikrishna & Manickam, 2017). Ya que, por raro que parezca, el desconocimiento de las formas de contaminación hace que los seres humanos realicemos actividades que introducen productos y/o subproductos nocivos en formas y cantidades que el ambiente no puede tolerar. Al mismo tiempo, a medida que aumenta la población humana aumentan las actividades que impactan negativamente al ambiente (Ukaogo et al., 2020).

En consecuencia, conocer las causas y las consecuencias de la contaminación ambiental es de vital importancia, ya que el coste de la inacción es enorme. De los diferentes tipos de contaminación, existen tres tipos principales: la del aire, la del agua y la del suelo.

Contaminación del agua

El agua es un recurso indispensable para la vida y el sostenimiento del ambiente. Los recursos hídricos naturales son la principal fuente de agua para las actividades agrícolas, domésticas, ambientales, industriales y recreativas. La composición de la superficie terrestre está compuesta por 25% de tierra y un 75% de agua. El 97% del agua superficial es salina y el agua dulce sólo representa el 3%, de los cuales más de dos tercios están presentes en forma de glaciares. Además, una gran parte del resto de agua dulce, no congelada, es agua subterránea y el resto está en el aire o en la superficie. El agotamiento y disminución de forma constante del suministro de agua en el mundo pone en peligro la vida en nuestro planeta (Hossain, 2019).

El agua superficial es la que se encuentra en humedales de agua dulce, lagos y ríos. De manera natural se rellena y se pierde por la descarga y la precipitación hacia la evapotranspiración, la evaporación, los océanos y la recarga de las aguas subterráneas. Aunque la precipitación se considera el único aporte natural en los sistemas de agua superficiales, se deben tener en cuenta otros aspectos que también afectan la cantidad total de agua disponible en un momento determinado y a las proporciones de pérdida de agua en el sistema (Hossain, 2019).

Un aspecto de suma importancia es la cantidad total de agua disponible en un periodo determinado. La principal diferencia entre las aguas superficiales y subterráneas, en

relación con el aporte, se encuentra en el volumen de almacenamiento, siendo mayor en las aguas subterráneas. Esto permite que el ser humano utilice las aguas subterráneas de forma desmedida durante largos periodos de tiempo sin pensar en las graves repercusiones. Además, la contaminación es debida a la rápida urbanización y por ende la pérdida de aguas subterráneas. Para cubrir el suministro de agua a los particulares y concentrar y tratar las aguas residuales, se necesita una gran inversión por parte de los particulares y empresas en infraestructura hídrica. Aunque se podría tratar y utilizar una parte del agua, tendría un alto coste para ser aprovechada (Hossain, 2019).

Se calcula que al día una persona necesita 50 L de agua para cubrir la necesidad básica en el ámbito doméstico. De los diversos usos del agua, el más relevante es el agua potable, la cual constituye agua de calidad adecuada para el consumo o utilizada sin ningún riesgo, denominada también agua limpia. El agua que se suministra para uso comercial, industrial o doméstico en la mayoría de los países desarrollados cumple con alguna norma de agua potable. Por otra parte, el 22% del uso global del agua se le atribuye al consumo industrial urbano, teniendo las principales aplicaciones en las centrales termoeléctricas, las plantas de fabricación, las refinerías de minerales y petróleo y las presas hidroeléctricas. En dichos procesos, el agua puede fungir como disolvente, refrigerante o reactivo químico. Aunque en algunas de estas aplicaciones industriales la extracción de agua puede ser elevada, este consumo y sigue siendo menor que el de la agricultura (Hossain, 2019).

Contaminantes emergentes

Los avances en la ciencia y la tecnología, desde hace ya varias décadas, han tenido un impacto significativo en el estilo de vida y las actividades del ser humano. En gran medida estos avances han sido posibles gracias a la química sintética, provocando un aumento significativo en la producción de productos de higiene y cuidado personal, productos para el hogar, aditivos industriales y fármacos. Se reporta que entre los años 1930 y 2000, la producción anual mundial de productos antropogénicos aumentó de 1 a 400 millones de toneladas (Nawaz & Sengupta, 2018).

La clasificación y definición de los CE se ha mantenido en continua actualización, esto debido a que, contaminantes que en su tiempo fueron un problema ambiental podrían en la actualidad dejar de considerarse como tales y viceversa. Algunos autores se refieren

a los CE o “contaminantes de preocupación emergente” como: el conjunto de sustancias químicas y materiales naturales y/o sintéticos, que se han detectado o se sospecha que están presentes en diferentes compartimentos ambientales y cuya toxicidad y/o persistencia podrían alterar significativamente el metabolismo de los seres vivos y el ambiente (Freyria, Sannino, & Bonelli, 2020). Una de las principales características de los CE es que no necesitan persistir en el ambiente, ya que sus altas tasas de remoción/transformación se ven compensadas por la liberación continua en el ambiente a un ritmo cada vez mayor, confiriéndoles una cierta “pseudopersistencia”(Tondera et al., 2018). Además, NORMAN network (Red de referencia, centros de investigación y organizaciones afines para el seguimiento de sustancias ambientalmente emergentes) define a los CE como *“contaminantes que actualmente no están incluidos en los programas de seguimiento rutinario a nivel europeo y que pueden ser candidatos a una futura regulación, en función de la investigación sobre su (eco) toxicidad, sus posibles efectos sobre la salud y la percepción del público y de los datos de seguimiento relativos a su presencia en los distintos compartimentos ambientales”* (Dulio et al., 2018). Actualmente, se consideran a más de 1000 compuestos como CE, y se han clasificado en 16 clases: toxinas de algas, anticorrosivos, agentes antiespumantes y complejantes, antioxidantes, detergentes, subproductos de la desinfección, retardantes de llama, fragancias, aditivos de gasolina, nanopartículas, sustancias perfluoroalquiladas, productos de cuidado personal, pesticidas, productos farmacéuticos y plastificantes (Teodosiu, Gilca, Barjoveanu, & Fiore, 2018).

Desde hace algunas décadas, gracias a diversos estudios científicos, se ha hecho evidente el posible daño que los CE pueden causar a los componentes hídricos. Este hecho ha impulsado la investigación científica en busca de soluciones para la identificación, monitoreo y remoción de estos compuestos (da Silva Vilar et al., 2021). Aproximadamente 700 contaminantes y metabolitos emergentes diferentes son eliminados de manera irregular en el ambiente (Lamastra, Balderacchi, & Trevisan, 2016). La falta de información sobre el destino, transporte y el potencial tóxico de estas sustancias químicas agrava aún más el problema, dificultando el desarrollo de leyes y normas que contemplen la gestión de los CE en el ambiente (Lamastra et al., 2016; Taheran, Naghdi, Brar, Verma, & Surampalli, 2018).

Los CE están presentes en productos que utilizamos diariamente como los productos de cuidado personal, plastificantes, productos farmacéuticos, pesticidas, tensoactivos, etc., sumado a que, a corto plazo se ve muy difícil la eliminación de estas sustancias de los productos. Sin embargo, la opinión general de los científicos es que la intervención en materia legislativa de los gobiernos puede contribuir al control de la contaminación debido a estos compuestos (Taheran et al., 2018).

Actualmente, la regulación de los CE es escasa en el mundo, sin embargo la Unión Europea y Estados Unidos han realizado esfuerzos por generar una lista de sustancias prioritarias y de reducir su liberación en el ambiente. Además, países como Canadá y Suiza han llevado a cabo varios proyectos enfocados en desarrollar estrategias para mejorar las tecnologías empleadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y de esta manera reducir la liberación de los CE al ambiente (J. C. Gibson, 2020; Gorito, Ribeiro, Almeida, & Silva, 2017; Pistocchi, Dorati, Aloe, Ginebreda, & Marcé, 2019).

El origen de los CE puede rastrearse hasta las respectivas plantas de fabricación. Sin embargo, después de salir de su lugar de origen, sus rutas de exposición ambiental se vuelven complejas, poco conocidas y diferentes entre los entornos rurales y urbanos (Wilkinson, Hooda, Barker, Barton, & Swinden, 2017). En la figura 2 se representa las principales fuentes de origen y ruta de los CE hacia el ambiente. Se considera a los efluentes de las PTAR como la principal fuente de liberación de CE a las aguas superficiales, y que posteriormente pueden llegar a los sedimentos, el suelo, las aguas subterráneas y los océanos. Esto sucede ya que la mayoría de las PTAR están diseñadas para una depuración parcial de las aguas residuales (reducción de la demanda biológica de oxígeno, compuestos de nitrógeno y fósforo y patógenos), dejando fuera de este diseño a los CE, los cuales se encuentran en concentraciones muy bajas (μgL^{-1} - ngL^{-1}) (Besha et al., 2017; Dong et al., 2016).

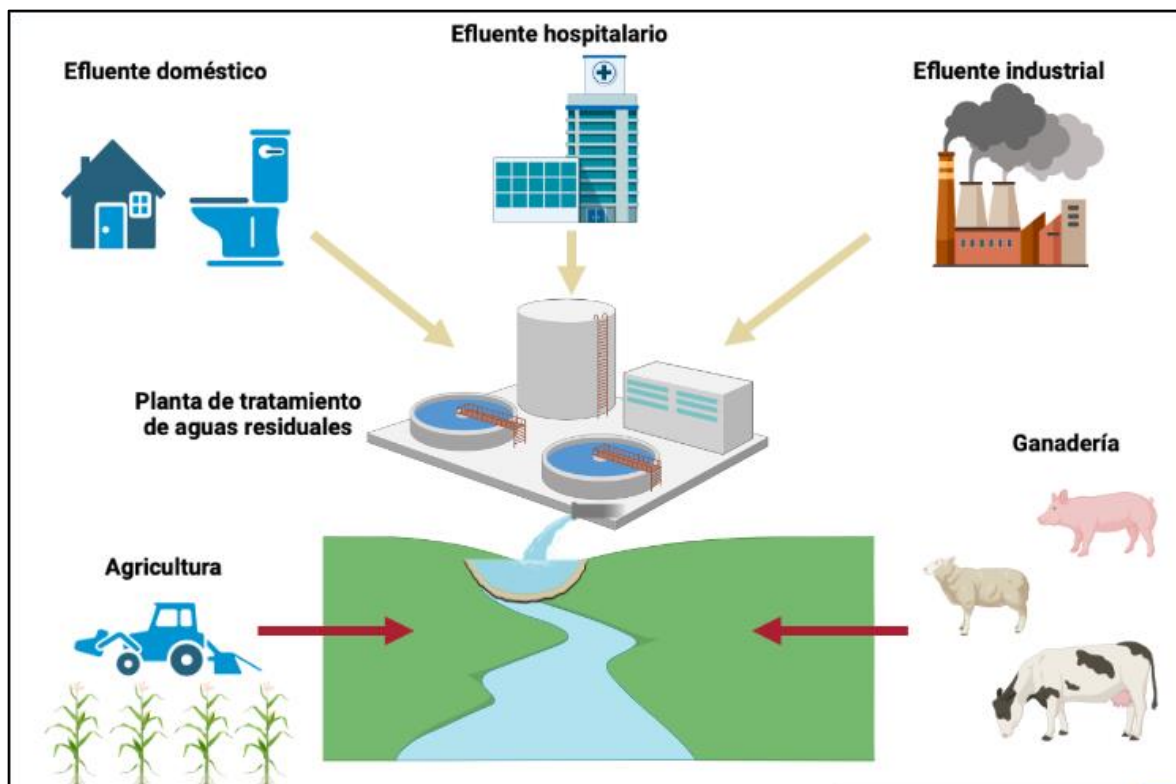


Figura 2. Representación gráfica de las principales fuentes de origen y ruta de los CE hacia el ambiente.

Productos farmacéuticos

En los últimos años, los productos farmacéuticos (PF) han recibido una creciente atención, considerándose como uno de los principales grupos de CE en el ambiente, ya que el consumo de fármacos en el mundo se ha incrementado significativamente, en especial los que no requieren de receta médica para su consumo (Rodríguez-Narvaez, Peralta-Hernandez, Goonetilleke, & Bandala, 2017). Además, para el año 2020 se estimó que el consumo mundial de medicamentos alcanzaría los 4,5 billones de dosis, y que el 50% de la población mundial consumiría más de 1 dosis/persona/día (Patel et al., 2019). Unas 3000 sustancias químicas diferentes son utilizadas en la fabricación de productos farmacéuticos; entre los fármacos más producidos, prescritos y consumidos se encuentran los antiinflamatorios y analgésicos, antibióticos, antidiabéticos, betabloqueadores, antiepilépticos/anticonvulsivantes, anticonceptivos, reguladores de lípidos y antidepresivos (da Silva Vilar et al., 2021; Patel et al., 2019).

Los PF son sustancias químicas activas que se utilizan en la prevención, diagnóstico y tratamiento de afecciones, enfermedades o molestias y, como consecuencia, son

importantes para garantizar la salud y una buena calidad de vida de una población (Phoon et al., 2020). Los PF son diseñados y fabricados para tener una actividad biológica y persistencia con el fin de garantizar su actividad terapéutica en los seres humanos y animales, lo que origina que estos productos se detecten en bajas concentraciones (ngL-1 - µgL-1) en diversas matrices acuáticas (Khasawneh & Palaniandy, 2021). Además, las propiedades fisico-químicas de los PF, como: polaridad, volatilidad, lipofilia, adsorción y persistencia, son factores que determinan la tasa de eliminación durante los procesos de eliminación en las PTAR (Majumder, Gupta, & Gupta, 2019).

Existen varias e importantes diferencias entre los PF y los demás contaminantes químicos, entre ellas destacan las siguientes: I) masas moleculares <500 Da, aunque no en todos los casos, II) son moléculas químicamente complejas, presentando diversas estructuras, formas, masas moleculares, y sustituyentes químicos, y III) pueden contener más de un grupo ionizable (Patel et al., 2019). Además, a) las propiedades y el grado de ionización de los PF depende de pH del medio, b) presentan propiedades lipofílicas, mientras que otros pueden tener una alta solubilidad en agua, c) pueden tener una capacidad de persistencia, ya que pueden bioacumularse en los diversos tejidos biológicos conservando su actividad intrínseca, y d) una vez que son absorbidos y distribuidos en el organismo pueden sufrir modificaciones metabólicas que alteran su estructura química y los efectos biológicos que puedan tener (Rivera-Utrilla, Sánchez-Polo, Ferro-García, Prados-Joya, & Ocampo-Pérez, 2013; Scott et al., 2019; Sun, Liu, & Lu, 2020).

La continua liberación de los PF a través de diferentes vías como las aguas residuales (Morone, Mulay, & Kamble, 2019), efluentes hospitalarios (Ekpeghere, Sim, Lee, & Oh, 2018), efluentes industriales (Na et al., 2019) y escorrentía de zonas ganaderas y agrícolas (Margenat et al., 2017), hace que estos compuestos se hayan denominado contaminantes “pseudo-persistentes” ya que esta continua introducción en el ambiente compensa las altas tasas de transformación y remoción que los PF puedan estar sufriendo. De las fuentes anteriormente mencionadas, los efluentes de las PTAR son los que han tenido un gran interés y estudio en los últimos años ya que a través de ellos se descarga continuamente una cantidad importante de PF a los ambientes acuáticos (Tran, Reinhard, & Gin, 2018).

En diversos estudios se ha puesto de manifiesto la limitada eficacia de los tratamientos utilizados en las PTAR para la remoción de estos compuestos (Gani, Hlongwa, Abunama, Kumari, & Bux, 2020; Mijangos et al., 2018; Pilli, Sellamuthu, Pandey, & Tyagi, 2020; Sathishkumar et al., 2020) dependiendo de la molécula en estudio y de los procesos aplicados para su remoción (Courtier, Cadiere, & Roig, 2019). Como consecuencia los PF son liberados al ambiente, detectándose en formas inalterada y/o metabolizada. De esta manera, diversos organismos se encuentran expuestos a los PF.

Aunque estos compuestos han estado presentes en las aguas residuales durante décadas, sólo recientemente comenzaron a ser cuantificados y reconocidos por su potencial tóxico para el ecosistema (Bilal, Mehmood, Rasheed, & Iqbal, 2020). Por todo lo anterior, es evidente la preocupación general acerca de la salud pública, ya que hay pocos estudios e informes acerca de los efectos tóxicos causados por estos compuestos contaminantes, presentes en el agua residual (Brunsch, ter Laak, Rijnaarts, & Christoffels, 2018), subterránea (Bilal et al., 2020), superficial (Rivera-Jaimes et al., 2018) y potable (Kondor et al., 2020) asociados a diversas mezclas de compuestos xenobióticos.

Fármacos antiepilépticos.

La epilepsia se define como una enfermedad neurológica caracterizada por convulsiones recurrentes y no provocadas. La Liga Internacional contra la Epilepsia define la epilepsia como: *"un trastorno del cerebro caracterizado por una predisposición permanente a las crisis epilépticas y las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición"* (Beghi, 2020). La prevalencia global de la epilepsia se reporta en 700 por cada 100.000 personas, afectando a más de 70 millones de personas en todo el mundo (Espinosa-Jovel, Toledano, Aledo-Serrano, García-Morales, & Gil-Nagel, 2018). El uso profiláctico de los fármacos antiepilépticos (FAE) se considera el tratamiento principal de la epilepsia, con el objetivo de eliminar las crisis con efectos negativos mínimos sobre el estado de ánimo, la cognición, la función endocrina y el bienestar general (Dasgupta & Krasowski, 2020).

Hasta 1990 se disponía de 16 fármacos anticonvulsivos, y 13 de ellos pueden clasificarse en cinco grupos químicos muy similares: barbitúricos, hidantoínas, oxazolidinedionas, succinimidas y acetilureas. Estos grupos tienen en común una estructura de anillo heterocíclico similar con una variedad de sustitutos. En los fármacos que comparten esta

estructura básica, los sustitutos del anillo cíclico determinan la clase de fármaco. Cambios muy pequeños en la estructura pueden alterar drásticamente el mecanismo de acción y las propiedades clínicas del compuesto. Los otros fármacos de este grupo activo, la carbamazepina, el ácido valproico y las benzodiazepinas, son estructuralmente diferentes, ya que hay nuevos compuestos en el mercado desde 1990, por ejemplo, felbamato, gabapentina, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, pregabalina, tiagabina, topiramato, vigabatrina y zonisamida (Trevor, Katzung, & Masters, 2019).

En general, los FAE actúan sobre distintas dianas a nivel molecular modificando selectivamente la excitabilidad de las neuronas, de modo que las descargas anormales, relacionadas con las convulsiones, pueden bloquearse sin afectar a la actividad neurológica normal. Una de las actividades más importantes para la señalización neuronal es la que se realiza a través de los canales iónicos. Cuando se produce el movimiento de iones a través de las membranas, se producen cambios de voltaje que provocan potenciales sinápticos y potenciales de acción. La interacción de los canales aniónicos y catiónicos presentes en la membrana que están abiertos en un momento determinado, y de forma muy selectiva para determinados iones, es lo que dará lugar a estos potenciales. La unión a ligandos (neurotransmisores) y los cambios de voltaje influyen directamente en las tasas de apertura y cierre de los canales (Biton et al., 1999). La activación de los canales iónicos y la permeabilidad diferencial son la forma de controlar la entrada y la salida de los iones. Los canales implicados en la mediación de la excitabilidad corresponden a los canales de sodio y de calcio, mientras que la inhibición es promovida por la apertura de los canales de cloruro y de potasio. Además, existen canales catiónicos inespecíficos, por ejemplo el canal catiónico hiperpolarizado Ih, que disminuye la excitación neuronal (Poolos, Migliore, & Johnston, 2002). La forma en que la transmisión sináptica en la red neuronal está mediada por los neurotransmisores excitatorios e inhibitorios. El principal neurotransmisor inhibitorio es el ácido γ -aminobutírico (GABA) y el glutamato (Glu) se considera el principal neurotransmisor excitador. La actividad anticonvulsiva exhibida por los diferentes compuestos de este grupo farmacéutico tiene diferentes y muy variadas dianas moleculares a nivel cerebral (Rutecki, 1995):

- I) Canales iónicos dependientes del voltaje (canales de potasio, calcio y sodio)
- II) Canales que regulan las propiedades intrínsecas de la membrana (canales de cationes no específicos, I_h)
- III) Receptores para el GABA y el glutamato (canales iónicos ligados)
- IV) Transportadores de neurotransmisores
- V) Enzimas metabolizadoras, sus receptores y los neurotransmisores

Al reducir la sincronización en los grupos neuronales y modificar las propiedades de ruptura en ellos, se puede obtener la actividad anticonvulsiva. Considerando los principios farmacológicos de este grupo de fármacos, se presentan los siguientes mecanismos de acción (Meldrum & Rogawski, 2007):

- a) Modulación de los canales iónicos dependientes de voltaje
- b) Aumento de la neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA
- c) Atenuación de la transmisión excitatoria, especialmente mediada por el glutamato

Dentro del grupo de fármacos que actúan a través de los canales iónicos dependientes de voltaje se encuentran la fenitoína, la lamotrigina, la carbamazepina, la oxcarbazepina y la zonisamida mediante el bloqueo de las descargas repetitivas de alta frecuencia, estos fármacos están relacionados principalmente con la unión al canal de Na⁺ dependiente de voltaje en estado inactivo, inhibiendo durante la polarización y eliminando este bloqueo en la hiperpolarización. Las pruebas realizadas en animales de experimentación han sugerido que la excitabilidad anormal de las neuronas piramidales CA₃ del hipocampo está directamente relacionada con la disfunción de los canales de calcio y, por tanto, con los procesos epilépticos (Kiura et al., 2003). Los canales de calcio se agrupan en dos grupos: de alto y de bajo voltaje. Dentro de los canales de alto voltaje activados se encuentran los subtipos L, N, P, Q y R, que son responsables de la regulación de los neurotransmisores en las terminales nerviosas presinápticas y postsinápticas a través de la regulación del suministro de calcio. Además, están directamente implicados en la expresión de genes específicos y en la activación de canales iónicos dependientes del calcio, con los correspondientes cambios en la

excitabilidad. El efecto anticonvulsivo se atribuye al bloqueo de estos canales y a la inhibición en la liberación de Glu (neurotransmisor excitatorio) (Turner, 1998).

Actividad sináptica:

1. El fármaco puede realizar su acción modulando las neuronas o los receptores del neurotransmisor inhibitor GABA, ejemplos de estos fármacos son las benzodiazepinas y los barbitúricos. De forma moderada el felbamato y el topiramato también actúan afectando a los receptores GABA. Entre las dianas moleculares potencialmente importantes relacionadas con el GABA se encuentran los receptores ionotrópicos del N-metil-D-aspartato (NMDA), del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) y del kainato (KA). Además, estos receptores son responsables, en varias sinapsis, de la excitación mediada por el Glu. Este neurotransmisor, que se libera sinápticamente, también puede activar receptores metabotrópicos de Glu acoplados a proteínas G, que conducen a la inhibición o excitación de aquellas neuronas que expresan este tipo de receptores (metabotrópicos) y dependiendo del subtipo del mismo (Stefan & Feuerstein, 2007).
2. Los transportadores (GABA), que se localizan en las terminaciones nerviosas presinápticas y en las células gliales, terminan la acción sináptica. Se han identificado cuatro proteínas transportadoras: TAG-1, TAG-2, TAG-3 y BGT-1. La actividad de estos transportadores está directamente relacionada con los gradientes transmembrana de Na^+ y Cl^- , en el transporte de GABA (Stefan & Feuerstein, 2007).
3. Glu: antes de la activación de los canales de calcio activados por alto voltaje, se produce una despolarización terminal causada por los potenciales de acción dependientes del sodio. Esto provoca la exocitosis de vesículas sinápticas que contienen Glu y otros neurotransmisores. Al bloquear los canales de sodio, se puede inhibir la liberación de Glu (sinaptosomas) (Lingamaneni & Hemmings, 1999).

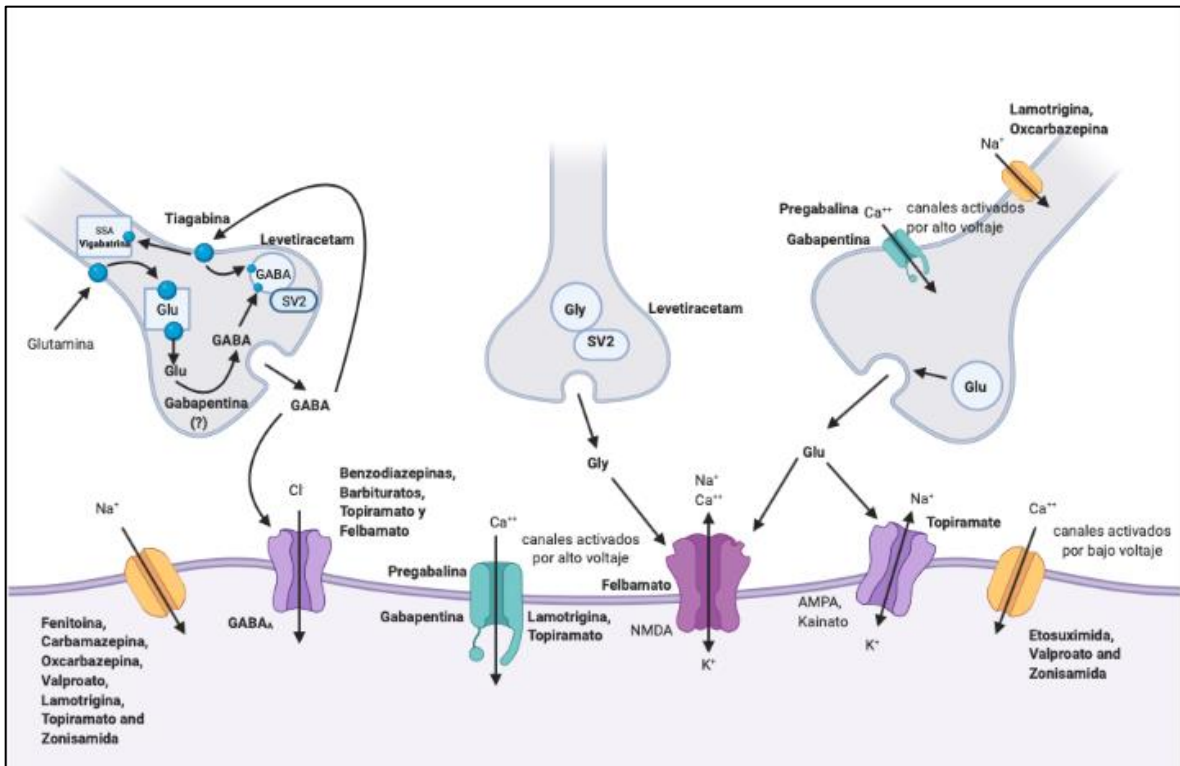


Figura 3. Mecanismos de acción más importantes de los fármacos antiepilépticos. Principales dianas moleculares en Glutamato, GABA y neuronas postsinápticas.

Consumo mundial de FAE

En las últimas décadas se ha producido un aumento significativo del consumo de FAE, como se muestra en la tabla 1. Esto puede deberse al amplio uso de estos fármacos para tratar otras afecciones, ya que han presentado efectos como: antiarrítmico (L. Zhang et al., 2018), actividad anti-neuralgia (Hall, Wheless, & Phelps, 2020), dolor neuropático (Kopsky & Hesselink, 2017), curación de heridas (Keppel Hesselink, 2018; Şimşek, Ciftci, Karadag, Karatas, & Kizilay, 2014), trastorno bipolar y neuralgia del trigémino (Dasgupta & Krasowski, 2020), tratamiento del trastorno por consumo de alcohol (Mason, Quello, & Shadan, 2018), el tratamiento de los trastornos de ansiedad o para el alivio a corto plazo de los síntomas de ansiedad o de la ansiedad asociada a los síntomas depresivos (Walker, Choi, & Ray, 2019)

Rogawski & Löscher, 2004, por ejemplo, demostraron que en 2003 cerca de la mitad de las prescripciones de FAE en los Estados Unidos eran para afecciones distintas de la epilepsia. Además, en Noruega, entre 2008 y 2012, el uso de FAE en trastornos no

relacionados con la epilepsia representó el 45-53% del uso total (Baftiu et al., 2016). Del mismo modo, Berman, Marom, Ekstein, Blatt, & Eyal, 2016 demostraron que en Israel, los FAE utilizados con mayor frecuencia eran la lamotrigina y el levetiracetam, seguidos de la carbamazepina, el clonazepam, el ácido valproico, el fenobarbital y la fenitoína. Sin embargo, los datos de ventas indican que la carbamazepina y la fenitoína se vendieron más que la lamotrigina, lo que sugiere que la fenitoína es recetada a pacientes externos por médicos que no son especialistas en epilepsia.

Tabla 1. Prescripción de FAE en diferentes países alrededor del mundo

	FAE	Año	Prescripciones por año	Referencia
América del norte			Estados Unidos	
	Gabapentina	2017	46,043,168	Kane, 2018
	Lamotrigina		12,053,691	
	Carbamazepina		3,516,204	
	Oxcarbazepina		2,452,465	
	Fenitoína		2,348,516	
	Primidona		2,075,116	
	Levetiracetam		6,832,916	
	Topiramato		10,388,097	
	Diazepam		5,184,806	
	Pregabalina		11,152,692	
	Zonisamida		1,011,331	
América del sur			Brasil	
	Carbamazepina	2018	6,185,991	IQVIA, 2019
	Clonazepam		26,965,289	
	Diazepam		4,394,869	
	Lamotrigina		3,008,975	
	Oxcarbazepina		2,240,308	
	Clobazam		2,079,291	
	Valproato de sodio		1,959,907	
Europa			Escocia	

			Information Services Division National Services Scotland, 2018
Carbamazepina	2016	216,405	
Gabapentina		694,293	
Lacosamida		14,093	
Lamotrigina		209,754	
Levetiracetam		131,962	
Etosuximida		2,576	
Oxcarbazepina		6,163	
Fenobarbital		20,700	
Fenitoina		63,563	
Pregabalina		435,496	
Primidona		12,469	
Retigabina		253	
Rufinamida		820	
Valproato de sodio		200,321	
Tiagabina		343	
Topiramato		59,160	
Vigabatrina		1,615	
Diazepam		874,810	
Zonisamida		9,257	
			Gales
Pregabalina	2017	450,022	National Statistics Ystadegau Gwladol, 2018
Levetiracetam		140,769	
Total de prescripciones		1,523,183	
			Inglaterra
Total de prescripciones	2017	26,649,311	Prescribing and Medicines Team Health and Social Care Information Centre, 2018
			Países Bajos
Pregabalina	2018	19,024,700	Zorginstittud Nederland, 2018
Diazepam		11,385,741	
Ácido valproico		12,115,800	

Levetiracetam	9,511,000
Carbamazepina	6,358,900
Lamotrigina	5,573,700
Gabapentina	4,554,900
Topiramato	1,650,500
Oxcarbazepina	1,607,800
Fenitoina	1,548,100
Fenobarbital	1,151,500
Clonazepam	1,087,700
Lacosamida	881,740

Estonia

Ácido valproico	2018	4,907	Kurvits et al., 2020
-----------------	------	-------	----------------------

Irlanda del Norte

Carbamazepina	2018	79,552	Mulholland, 2018
Gabapentina		207,386	
Lacosamida		10,292	
Lamotrigina		112,940	
Levetiracetam		63,811	
Etosuximida		1,064	
Oxcarbazepina		1,819	
Fenobarbital		7,363	
Fenitoina		13,866	
Pregabalina		341,169	
Primidona		2,915	
Valproato de sodio		78,180	
Tiagabina		108	
Topiramato		23,557	
Vigabatrina		1,019	
Diazepam		592,353	
Midazolam		3,541	
Perampanel		2,521	

Clobazam	9,029
Ácido valproico	3,119
Clonazepam	20,943
Zonisamida	8,036

Ocurrencia y distribución espacial de los FAE en los sistemas de agua

Para predecir, regular y comprender los riesgos que los productos farmacéuticos representan para el medio ambiente, es importante determinar su destino y abundancia una vez que entran en el medio ambiente.

Los FAE se introducen en el medio ambiente principalmente a través del vertido de efluentes de las plantas municipales de tratamiento de aguas residuales y/o de efluentes hospitalarios. Esto se debe a que los FAE no pueden ser eliminados completamente mediante los procesos actuales de las PTAR. Por ejemplo, varios estudios han sugerido que los FAE pueden resistir los procesos de degradación, como la fotodegradación, la degradación química o la biodegradación (Bernhard, Müller, & Knepper, 2006; Yujie He, Sutton, Rijnaarts, & Langenhoff, 2016; Y. Li, Zhang, Ding, & Liu, 2020; Tadkaew, Hai, McDonald, Khan, & Nghiem, 2011; Villegas- Guzman et al., 2017). Además, también se ha demostrado que tras una mínima degradación en las PTAR, estos fármacos pueden infiltrarse en las aguas subterráneas y ser absorbidos por organismos vivos (Arnold, Brown, Brown, Ankley, & Sumpter, 2014).

Tras su liberación de las PTAR, los FAE se distribuyen ampliamente en las aguas superficiales de todo el mundo. La carbamazepina, la gabapentina, la lamotrigina y la primidona han sido los FAE más frecuentemente detectados en los ríos y lagos del mundo. Sin embargo, otros FAE como el topiramato, la fenitoína y la primidona también se han encontrado en concentraciones mucho más bajas. Esto puede deberse a la fuerte adsorción de estos compuestos en los sedimentos de los ríos (Ying, Zhao, Zhou, & Liu, 2013).

Hasta ahora, la mayoría de los estudios que han informado sobre la presencia de FAE en los medios acuáticos se han centrado en las aguas superficiales. Otro vínculo común entre estos estudios es la proximidad de las aguas superficiales a las plantas de

tratamiento de aguas residuales. Esta característica debe ser destacada ya que se ha encontrado una mayor concentración de FAE en aguas superficiales que reciben vertidos de aguas residuales urbanas (Bai et al., 2018; Ismail, Wee, Kamarulzaman, & Aris, 2019; Mijangos et al., 2018; Simazaki et al., 2015).

La dilución también puede desempeñar un papel importante en la abundancia de FAE. Camacho-Muñoz, Martín, Santos, Aparicio, & Alonso, 2010, por ejemplo, encontraron que la carbamazepina alcanzaba concentraciones de hasta 1.1 µg/L en cuerpos de agua pequeños. En cambio, en grandes ríos, lagos o agua de mar, la carbamazepina se encontró en concentraciones más bajas (0.04 µg/L) (Klosterhaus, Grace, Hamilton, & Yee, 2013). Esto puede deberse a que las masas de agua pequeñas reciben efluentes de aguas residuales con menor dilución (Ying et al., 2013). Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender de forma exhaustiva los factores que afectan a la abundancia de FAE en los diferentes sistemas acuáticos.

La distribución espacial de los FAE se presenta en la figura 4. Como se puede observar estos fármacos están ampliamente distribuidos en cinco de los seis continentes del planeta. Hasta ahora la carbamazepina es el FAE más frecuentemente detectado, alcanzando concentraciones de hasta 3.5 µg/L en Brasil (Pivetta, Rodrigues-Silva, Ribeiro, & Rath, 2020). El segundo lugar lo ocupa la gabapentina, con concentraciones de hasta 9.8 µg/L en los efluentes de un hospital en Estados Unidos (T. S. Oliveira et al., 2015).

La lamotrigina y la primidona ocupan el tercer lugar en la lista de ocurrencia, con concentraciones máximas de 2.8 µg/L (aguas superficiales) y 0.7 µg/L (ciclo urbano del agua), respectivamente (Hass, Duennbier, & Massmann, 2012; Kondor et al., 2020). El cuarto y quinto lugar lo ocupan el diazepam (1.0 µg/L, agua de riego) y la fenitoína (1.4 µg/L, estuario), ambos compuestos detectados en España (Margenat et al., 2017; Mijangos et al., 2018). La oxcarbazepina se encuentra en el sexto lugar de la lista, exhibiendo una concentración máxima de 1.2 µg/L en aguas residuales en Arabia Saudí (Alidina et al., 2014).

Los siguientes lugares los ocupan el fenobarbital (0.4 µg/L, efluente hospitalario), la pregabalina (6.9 µg/L, efluente hospitalario), lacosamida (0.06 µg/L, agua superficial), el

levetiracetam (10.8 µg/L, agua residual) y, por último, el topiramato (0.2 µg/L, agua residual) (Gurke et al., 2015; Kondor et al., 2020; T. S. Oliveira et al., 2015)

Las diferencias en la aparición y distribución espacial que presentan estos fármacos podrían deberse a la disponibilidad y a las tasas de consumo de FAE en los distintos países. Fekadu, Alemayehu, Dewil, & Van der Bruggen, 2019, por ejemplo, realizaron un estudio para comparar la presencia de productos farmacéuticos en entornos de agua dulce en el contexto africano y europeo. Según sus resultados, uno de los factores más importantes que rige el patrón de aparición y la distribución espacial de los productos farmacéuticos individuales en el medio ambiente es su tendencia de consumo. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en los países desarrollados, el número de productos farmacéuticos y sus tendencias de consumo no están fácilmente disponibles para África. Por lo tanto, es imposible evaluar experimentalmente los peligros y riesgos de estos fármacos de manera oportuna.

Las diferencias en las tecnologías de eliminación y cuantificación también pueden ser una razón importante por la que los países en desarrollo no han informado de la presencia de estos fármacos en los medios acuáticos. En las dos últimas décadas han surgido muchos estudios en países desarrollados y de ingresos medios, mientras que los países en desarrollo siguen estando rezagados en cuanto a la identificación y cuantificación de los FAE en muestras ambientales (Cardoso-Vera et al., 2021). Cabe destacar en los artículos de revisión desde la perspectiva africana la mención de algunas dificultades como los sistemas de saneamiento deficientes, la falta de infraestructura para el análisis rutinario de trazas de contaminantes ambientales y la escasez de personal bien capacitado para el funcionamiento de los equipos de última generación necesarios para el análisis de contaminantes emergentes en el agua (Gwenzi & Chaukura, 2018; Madikizela, Tavengwa, & Chimuka, 2017). Así, las diferencias tecnológicas y la ineficacia de los procesos que se presentan en las distintas EDAR también pueden hacer fluctuar la abundancia de estos fármacos.

Otros factores que también pueden desempeñar un papel importante en la aparición y distribución de estos fármacos en los ecosistemas marinos y de agua dulce son: el tratamiento incontrolado de las aguas residuales, el vertido de los procesos de fabricación de fármacos, los vertidos domésticos de los asentamientos informales sin

propiedades ambientales, como la temperatura, la salinidad y los valores de pH. Además, la velocidad del flujo de agua, el tamaño y la forma de las partículas y la morfología del lecho del río también pueden afectar a la caída de las partículas. En consecuencia, las partículas que caen en el sedimento pueden resuspenderse en el agua.

Dado que los sedimentos acumulan contaminantes y pueden ser transportados a través de las diferentes masas de agua, estos siguen siendo fuentes potenciales de efectos adversos en las aguas superficiales y subterráneas (Babić & Mutavdžić Pavlović, 2013). Además, los lodos de depuradora, producto final de las PTAR, se utilizan en el suelo como fuente de nutrientes o como acondicionador del suelo. Sin embargo, los compuestos lipofílicos y no fácilmente biodegradables, como los FAE, quedan retenidos en los lodos donde se acumulan. De este modo, los lodos de depuradora pueden ser también una fuente potencial de sustancias nocivas para los seres humanos y los animales. Por otra parte, al aplicar los lodos de depuradora contaminados al suelo, los compuestos que contienen también pueden liberarse parcialmente, llegando a capas más profundas del suelo o a las aguas subterráneas a través de la escorrentía y la lixiviación (Lees, Fitzsimons, Snape, Tappin, & Comber, 2016; Park & Lee, 2018; Patel et al., 2019).

Como consecuencia, se han detectado ampliamente anticonvulsivos en suelos, sedimentos y lodos de todo el mundo. En la última década, han aumentado los estudios que evalúan la presencia, el destino y el comportamiento de los FAE en matrices ambientales sólidas. Sin embargo, estas investigaciones son aún menos numerosas en relación con los estudios realizados en matrices acuosas.

Los datos sobre las concentraciones de FAE en matrices sólidas se muestran en la tabla 2. En varios países del mundo, el uso de aguas residuales como agua de riego para las tierras agrícolas es una práctica bien establecida. Sin embargo, este hábito puede conducir a la acumulación de FAE en el suelo y a su posterior lixiviación en las aguas subterráneas. R. Gibson, Durán-Álvarez, Estrada, Chávez, & Jiménez Cisneros, 2010, por ejemplo, informaron de la persistencia y el potencial de lixiviación de varios fármacos, incluida la carbamazepina, en los suelos del Valle de Tula, en México. Según sus resultados, la carbamazepina fue el fármaco más persistente en el suelo, con concentraciones equivalentes a varios años de riego (2.6-7.5 µg/kg). Además, cabe

destacar que este fármaco también estaba presente en el suelo más profundo, y que los patrones de concentración estaban alta y positivamente correlacionados con la concentración de materia orgánica del suelo. En base a estos resultados, se puede sugerir que la carbamazepina tiene un alto potencial de contaminación de las aguas subterráneas.

Otro estudio a destacar fue el realizado por Martínez-Piernas, Plaza-Bolaños, García-Gómez, Fernández-Ibáñez, & Agüera, 2018. Cuantificaron los microcontaminantes orgánicos en suelos agrícolas regados con aguas residuales recuperadas durante más de diez años. Entre los FAE detectados en este estudio se encontraban carbamazepina, primidona, lamotrigina y diazepam, con concentraciones máximas de 8.2, 6.5, 2.6 y 0.81 µg/kg respectivamente. Estas concentraciones podrían explicarse por su presencia recurrente y las altas concentraciones reportadas en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales.

Por último, en 2016, Paz et al., 2016, reportaron el comportamiento de dos de los fármacos anticonvulsivos más persistentes (lamotrigina y carbamazepina) así como de dos de sus metabolitos, en suelos agrícolas. Según sus resultados, la sorción de los compuestos en los suelos fue la siguiente: lamotrigina > carbamazepina > EP-CBZ > DiOH-CBZ. Por otra parte, también encontraron que la sorción seguía un proceso reversible sin competencia entre los sorbatos.

Tabla 2. FAE en matrices sólidas

País	Matriz	Concentración Min – Max (µg/kg)	Limite de cuantificación (ng/g)	Frecuencia de detección (%)	Referencia
México	Suelo	5.14-6.48	0.5	100	(Durán-Alvarez, Becerril-Bravo, Castro, Jiménez, & Gibson, 2009)
México		2.6-7.5	0.5	100	(R. Gibson et al., 2010)
Estados Unidos		0.7-1.1	NA	100	(C. Wu, Spongberg, Witter, Fang, &

					Czajkowski, 2010)
Israel		21.1-326.1	4	100	(Arye, Dror, & Berkowitz, 2011)
Túnez		0.28-0.94	0.25	100	(Fenet et al., 2012)
República Checa		96-144	5	100	(Koba, Golovko, Kodešová, Klement, & Grabic, 2016)
Israel		2.2-6	100	ND	(Paz et al., 2016)
España		0.08-1.36	NA	ND	(Biel-Maeso, Baena-Nogueras, Corada-Fernández, & Lara-Martín, 2018)
España		0.10-8.2	0.1	100	(Martínez-Piernas et al., 2018)
Estados Unidos		50	NA	ND	(Thelusmond, Kawka, Strathmann, & Cupples, 2018)
España	Sedimento	1.43-6.85	0.5	100	(Vazquez-Roig, Segarra, Blasco, Andreu, & Picó, 2010)
Estados Unidos		1-4	0.3	65	(Lara-Martín, Renfro, Cochran, & Brownawell, 2015)
Sudáfrica		<0.535-6.07	0.5352	100	(Matongo, Birungi, Moodley, & Ndungu, 2015)

Portugal		1.82	1.20	ND	(L. H. M. L. M. Santos, Ramalhosa, Ferreira, & Delerue-Matos, 2016)
Mar báltico		6.3-14	0.1	86	(Björleinius et al., 2018)
India		3-519	NA	100	(Chakraborty et al., 2019)
Serbia/Rumania		0.5-0.9	0.1	ND	(Matić Bujagić, Grujić, Laušević, Hofmann, & Micić, 2019)
Suecia		<0.064-1.1	0.042-1.5	100	(Golovko, Rehrl, Köhler, & Ahrens, 2020)
España	Lodo	18.4-460	14.8	91.6	(Martín, Camacho-Muñoz, Santos, Aparicio, & Alonso, 2012)
China		74-44941	13.8	100	(Dong et al., 2016)
Australia		300	NA	100	(S. Yang et al., 2016)
España	Suelo	0.14-0.81	0.1	42.8	(Martínez-Piernas et al., 2018)
SEspaña	Sedimento	2.50-4.65	2.3	100	(Vazquez-Roig et al., 2010)
Israel	Suelo	1.5-8.5	100	ND	(Paz et al., 2016)
España		0.04-2.6	0.01	50	(Martínez-Piernas et al., 2018)
China	Suelo	1.6-3.3	1.1	69	(F. Chen et al., 2011)

España	5.6-6.5	0.1	25	(Martínez-Piernas et al., 2018)
--------	---------	-----	----	---------------------------------

ND= no disponible

Bioacumulación de FAE en especies acuáticas

Recientemente, algunos estudios revelaron la presencia de FAE en organismos acuáticos aguas abajo de las PTAR, lo que indica que estos compuestos tienden a acumularse en la biota (J. Liu et al., 2015; Vernouillet et al., 2010; Xie et al., 2017).

Las branquias, la piel y el tracto gastrointestinal son las principales vías de entrada de los FAE en los organismos acuáticos (Mackay, Celsie, Powell, & Parnis, 2018). Una vez en el organismo, dependiendo de sus propiedades inherentes, los FAE se distribuyen en los tejidos y se acumulan principalmente en los órganos ricos en lípidos y proteínas.

Los factores de bioacumulación (FBC) y bioconcentración de los FAE en los organismos acuáticos se presentan en la Tabla 3. Se decidió incluir solo los compuestos parentales, ya que estos son casi siempre más potentes y más lipofílicos que los metabolitos (Grabicova et al., 2017).

Tabla 3. Bioconcentración y bioacumulación de antiepilépticos en la biota acuática

<i>Especie</i>	<i>Tejido</i>	<i>FBC</i>	<i>Concentración</i> (ng/g)	<i>Source</i>
CARBAMAZEPINA				
<i>Carassius auratus</i>	Cerebro, hígado, músculo y branquias	8.8 - 1200	0.1-1.2	(Liu et al., 2015)
<i>Cerastodema glaucum</i>	Organismo completo	-	0.2-6.3	(Moreno-González, Rodríguez-Mozaz, Huerta, Barceló, & León, 2016)
<i>Dreissena polymorpha</i>	Organismo completo	17 - 90	4.2 - 1211.7	(Contardo-Jara et al., 2011)
<i>Echinodorus horemanii</i>	Organismo completo	330	>6000	(Pi, Ng, & Kelly, 2017)

<i>Fundulus grandis</i>	Organismo completo	2.59-3.66	-	(Scott et al., 2019)
<i>Gambusia affinis</i>	Organismo completo	0.9	9 y 95	(Valdés, Amé, Bistoni, & Wunderlin, 2014)
<i>Geukensia demissa</i>	Organismo completo	7.9	1.3-5.3	(Klosterhaus et al., 2013)
<i>Hemiculter leucisculus</i>	Cerebro, hígado, músculo y branquias	77 - 2750	0.1-1.6	(J. Liu et al., 2015)
<i>Ictalurus punctatus</i>	Cerebro, hígado, músculo y plasma	1.5 - 7.1	2.6-302.6	(Garcia, Foster, Constantine, & Huggett, 2012)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Organismo completo	-	>3.5	(Martínez Bueno et al., 2013)
	Organismo completo	3.9	29.3	(Boillot et al., 2015)
	Organismo completo	1.4 - 2.2	0.53 - 13	(P. Oliveira et al., 2017)
<i>Pimephales notatus</i>	Cerebro, hígado, músculo y plasma	1.9 - 4.6	324 - 1503	(Garcia et al., 2012)
<i>Planorbid sp.</i>	Organismo completo	3.6	1.2	(Bowen Du, Haddad, Scott, Chambliss, & Brooks, 2015)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Organismo completo	2.2	10.2	(Vernouillet et al., 2010)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Organismo completo	0.7-1.2	0.03 - 5.9	(Almeida et al., 2015)
<i>Salmo trutta</i>	Hígado y músculo	-	0.60 - 1.1	(B. Du, Perez-Hurtado, Brooks, & Chambliss, 2012)
	Hígado	-	17.9	(Huerta, Jakimska, Gros, Rodríguez-Mozaz, & Barceló, 2013)

<i>Scrobicularia plana</i>	Organismo completo	-	4.5 - 9.3	(Almeida et al., 2017 ^a)
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Organismo completo	12.6	128.6	(Vernouillet et al., 2010)
DIAZEPAM				
<i>Gobius niger</i>	Hígado y músculo	-	3.5	(Moreno-González et al., 2016)
<i>Liza aurata</i>	Hígado y músculo	-	1.8	
<i>Pleuronichthys verticalis</i>	Hígado	-	23 - 110	(Maruya et al., 2012)
<i>Salmo trutta</i>	Hígado	-	10	(B. Du et al., 2012)
OXAZEPAM				
<i>Perca fluviatilis</i>	Músculo	6.2	0.39 - 13	(Brodin, Fick, Jonsson, & Klaminder, 2013)

Vernouillet et al., 2010 realizaron un estudio para determinar los factores de bioacumulación de la carbamazepina en especies acuáticas, como el alga verde (*Pseudokirchneriella subcapitata*), el crustáceo (*Thamnocephalus platyurus*) y el cnidario (*Hydra attenuate*). Según sus resultados, los factores de bioacumulación fueron de 2.2 para las algas y de 12.6 para los crustáceos. Además, no observaron ninguna bioacumulación significativa en *H. attenuata*. En concordancia con estos resultados, Garcia et al., 2012 determinaron los factores de bioconcentración de carbamazepina en dos especies de laboratorio (*Pimephales notatus* e *Ictalurus punctatus*) y en una especie procedente de una PTAR ubicada en Denton, Texas (*Oreochromis niloticus*). Tras 42 días de exposición, concluyeron que los valores obtenidos en los estudios de campo en *O. niloticus* (2.5-3.8) eran similares a los obtenidos en los estudios de laboratorio (*P. notatus*: 1.9 – 4.6; *I. punctatus*: 1.8 – 7.1). Del mismo modo, en China, Xie et al., 2017 investigaron la bioacumulación y la transferencia trófica de 23 productos farmacéuticos en el lago Taihu. La carbamazepina fue uno de los ocho compuestos detectados en todos los sitios de muestreo, alcanzando un factor de bioacumulación máximo de 318 en el hígado de los peces.

Hay varios artículos que indican que los FAE se bioacumulan en los peces de sistemas de agua dulce. Sin embargo, hay pocos estudios realizados en sistemas marinos.

(Maruya et al., 2012) investigaron la presencia y bioacumulación de 75 fármacos emergentes cerca de cuatro grandes vertidos de aguas residuales oceánicas en la bahía del sur de California. Según sus resultados, se detectó diazepam en todas las muestras de hígado de *Pleuronichthys verticalis*. Además, las concentraciones de diazepam en el hígado de los machos eran más altas en comparación con las concentraciones encontradas en el hígado de las hembras. Esto puede sugerir que el género también puede desempeñar un papel importante en la bioacumulación de estos fármacos. Sin embargo, es necesario seguir investigando para comprender mejor cómo las propiedades inherentes de las especies acuáticas y el medio ambiente afectan al proceso de bioacumulación.

Efectos tóxicos de los FAE en especies acuáticas

La ecotoxicidad se centra en los posibles efectos adversos de los xenobióticos, incluidos los fármacos, sobre los organismos que representan cada nivel trófico. Cuanta más información conozcamos sobre la ecotoxicidad de los fármacos, mejor será la gestión y la regulación sobre su seguridad.

Los efectos tóxicos de los FAE sobre las diferentes especies acuáticas se muestran en la tabla 4. Varios estudios han revelado que los FAE pueden perjudicar las funciones biológicas de los organismos a diferentes niveles. Fraz et al., 2019, por ejemplo, expusieron a adultos de pez cebra a 10 µg/L de carbamazepina durante 6 semanas. Los resultados obtenidos mostraron que la carbamazepina alteró el rendimiento reproductivo, el cortejo y el comportamiento agresivo de los peces. Además, se mantuvo la disminución del rendimiento reproductivo y la alteración del cortejo en las crías de los padres expuestos. Esto sugiere que los FAE pueden afectar al comportamiento y la reproducción de los peces de forma transgeneracional.

Los FAE también pueden alterar el desarrollo temprano de los peces, produciendo repercusiones en sus poblaciones futuras. Así lo demostraron Qiang et al., 2016, quienes evaluaron el fenotipo, el comportamiento y las respuestas moleculares de embriones de pez cebra expuestos a 1 µg /L de carbamazepina. En sus resultados se demostró que la tasa de eclosión, la longitud del cuerpo, la apariencia de la vejiga natatoria y la tasa de absorción del saco vitelino aumentaron significativamente. En concordancia con estos resultados, (Yide He et al., 2019) expusieron embriones de pez cebra a concentraciones

ambientalmente relevantes (0,1µg/L y 10 µg/L) de gabapentina. Al final de la exposición (96hpf), el contenido de acetilcolinesterasa, lisozima y proteína C reactiva se redujo significativamente en los embriones. Además, también demostraron que la gabapentina afecta simultáneamente a varias funciones vitales del pez cebrá en una fase temprana de su desarrollo.

Los estudios de toxicidad también han asociado los FAE con la generación de especies reactivas de oxígeno. Brandão et al., 2013, por ejemplo, evaluaron la respuesta al estrés oxidativo de tres FAE comúnmente encontrados en el ambiente (diazepam, carbamazepina y fenitoína). Según sus resultados, los tres compuestos parecían inducir estrés oxidativo en algún órgano. Sin embargo, no se encontró ningún daño oxidativo en el rango de concentración seleccionado.

En general, hay suficientes pruebas de que los FAE pueden alterar funciones biológicas clave (actividad metabólica, respuesta al estrés, comportamiento, reproducción y desarrollo) en los organismos acuáticos. Sin embargo, es necesario seguir investigando para comprender de forma exhaustiva las consecuencias ecológicas de los FAE en el medio acuático.

Tabla 4. Efectos tóxicos de los FAE en diversas especies acuáticas

Especie	Tiempo de exposición	Concentración	Efectos tóxicos	Referencia
CARBAMAZEPINA				
<i>Chironomus riparius</i>	10 y 21 días	0.2 - 31.4 µgL ⁻¹	Mortalidad significativa, redujo el crecimiento de los mosquitos e indujo un cambio significativo en la relación de sexos.	(Nieto et al., 2017)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	144 h y 30 días	500 - 10000 µgL ⁻¹	Inhibir el crecimiento de las algas. La síntesis de clorofila A se inhibió casi en su totalidad.	(W. Zhang et al., 2012)
<i>Cyprinus carpio</i>	24 h y 35 días	40 - 80 mgL ⁻¹	Alteración inducida en las actividades	(Malarvizhi, Kavitha,

			de las transaminasas en branquias, hígado y músculo. (CL ₅₀ 24 h= 59.7)	Saravanan, & Ramesh, 2012)
<i>Danio rerio</i>	63 días	0, 10 and 10000 µgL ⁻¹	La viabilidad de los huevos se vio significativamente perjudicada, se produjeron alteraciones en las etapas foliculares de las hembras, disminuyó la actividad de la CAT y aumentó la actividad de la GST en las branquias.	(da Silva Santos et al., 2018)
	118 hpf	100 µgL ⁻¹	Afectó a la velocidad de natación durante los periodos de oscuridad (más rápido), se observó un retraso en la eclosión hasta las 50 hpf.	(Zhou et al., 2019)
<i>Daphnia magna</i>	48 h	5 and 100 µgL ⁻¹	Alteración significativa del comportamiento fototáctico, disminución de la acetilcolinesterasa (neurotoxicidad) y estrés oxidativo que pone en peligro la vida.	(Nkoom, Lu, Liu, Yang, & Dong, 2019)

<i>Lepomis gibbosus</i>	96 h	62.5, 125, 250, 500 y 1000 µgL ⁻¹	Aumento de las actividades de las glutatión S-transferasas y de la glutatión reductasa en el tracto digestivo.	(Brandão et al., 2013)
<i>Limnodynastes peronii</i>	96 h	50 - 90 mgL ⁻¹	Pérdida de la respuesta táctil de los renacuajos.	(Melvin, Cameron, & Lanctôt, 2014)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	7, 21 y 42 días	1, 200 y 2000 µgL ⁻¹	El estrés oxidativo en las branquias, los niveles de glutatión reducido y la actividad de la Na ⁺ -K ⁺ -ATPasa fueron significativamente menores que en el control.	(Z. H. Li et al., 2009)
	96 h	5, 10, 15, 20,25 y 30 mg L ⁻¹	La CL ₅₀ a 96 h fue de 19,9 mg L ⁻¹ , el porcentaje de hemoglobina y el volumen celular empaquetado fueron significativamente altos, las actividades de SOD, CAT, GR y GPx fueron mayores en el intestino, el músculo y especialmente en el hígado.	(Z. H. Li et al., 2011)

<i>Ruditapes philippinarum</i>	28 días	30 - 9000 μgL^{-1}	Alterar las respuestas relacionadas con la energía, especialmente la del glucógeno y la del sistema de electrones, revelando una ralentización del metabolismo	(Almeida et al., 2015)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	144 h y 30 días	500 - 10000 μgL^{-1}	Inhibir el crecimiento de las dos algas. La síntesis de clorofila a se inhibió casi en su totalidad	(W. Zhang et al., 2012)
<i>Scrobicularia plana</i>	96h	0 - 9 μgL^{-1}	El contenido de glucógeno mostró una tendencia a la baja y un estado de estrés oxidativo.	(Almeida, Calisto, Esteves, et al., 2017)
		DIAZEPAM		
<i>Danio rerio</i>	24 h	16 μgL^{-1}	Induce efectos sedantes evidentes en los peces hembra, alterando sus niveles de actividad locomotora. Las hembras desarrollan una tolerancia más rápida.	(Genario et al., 2020)
<i>Daphnia magna</i>	Reproducción y respuestas transcriptómicas	0.001, 0.1 y 1 μgL^{-1}	Desregulación de las vías de señalización de la	(Fuertes, Campos, Rivetti,

			insulina, el ácido araquidónico y la biosíntesis de esteroides	Pinã, & Barata, 2019)
	Cambios en el comportamiento	0.1 and 1 μgL^{-1}	Alteración de la actividad locomotora, geotaxis y fototaxis	(Simão et al., 2019)
<i>Ictalurus punctatus</i>	7 días	0.001 μgL^{-1}	Puede tener el potencial de interactuar con la función endocrina alterando la expresión génica.	(Overturf, Overturf, & Huggett, 2016)
<i>Lepomis gibbosus</i>	96 h	266, 533, 1065, 2130 y 4260 μgL^{-1}	Aumento de las actividades de las glutatión S-transferasas en las branquias e inhibición de la glutatión reductasa en el tracto digestivo.	(Brandão et al., 2013)
		FENITOINA		
<i>Danio rerio</i>	5 dpf	1-500 μM	Las dosis altas poseen propiedades ansiolíticas e inhiben la actividad locomotora de las larvas, las dosis bajas la estimulan.	(X. Liu et al., 2016)
<i>Lepomis gibbosus</i>	96 h	6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μgL^{-1}	Respuestas adaptativas en las actividades de la catalasa y la glutatión S-	(Brandão et al., 2013)

			transferasas en el hígado, pero no alteraciones del comportamiento.	
		GABAPENTINA		
<i>Danio rerio</i>	96 hpf	0.1 y 10 μgL^{-1}	136 y 750 genes expresados diferencialmente, estaban implicados en los sistemas antioxidante, inmunitario y nervioso. Afecta a varias funcionalidades vitales del pez cebra.	(Yide He et al., 2019)

Difenilhidantoína (fenitoína)

La fenitoína (fig. 5), vendida comercialmente con el nombre de “Dilantin”, químicamente es una hidantoína que presenta efectos sobre los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} afectando los potenciales de membrana en concentraciones terapéuticas. De esta manera, la fenitoína bloquea los potenciales de acción altamente repetitivos de las neuronas manteniendo los canales de Na^+ en su estado inactivo. La fenitoína es un fármaco de primera generación que es utilizado en todos los tipos de crisis, exceptuando las crisis de ausencia. Fue el primer FAE que, en dosis terapéuticas, no provocaba una depresión del sistema nervioso central (SNC). La fenitoína se encuentra disponible comercialmente tanto en formulaciones orales (liberación normal y prolongada) como intravenosa. Se ha reportado la absorción de la fenitoína oral como lenta y variable, compensándose con una biodisponibilidad generalmente elevada. Además, los antiácidos que contienen calcio interfieren en la absorción del fármaco, si es necesaria la ingestión de antiácidos, se debe realizar de manera escalonada. Están documentados diversos casos en los que la fenitoína presenta diferencias en la biodisponibilidad, dependiendo de la presentación farmacéutica. Para las formulaciones de liberación normal y retardada los niveles

plasmáticos máximos se alcanzan en 1.5-3 h y de 4-12 h respectivamente. La fenitoína tiene una vida media de 12-36 h y puede tardar de 5 a y días en alcanzar el estado estacionario (tabla 5). Si bien, la administración de una dosis vía intravenosa puede alcanzar más rápidamente niveles séricos terapéuticos que una dosis oral, se asocia con efectos adversos significativos que normalmente afectan al sistema cardiovascular (hipotensión, bradiarritmias y paro cardiaco). En el lugar de la infusión pueden producirse reacciones locales (dolor y ardor), sin embargo, pueden producirse también efectos adversos significativos por lesiones de extravasación. En cuanto a las dosis orales son raros los efectos adversos, limitándose a náuseas y vómito. Tanto la vía de administración oral como intravenosa pueden provocar neurotoxicidad, nistagmo y ataxia (Gallop, 2010).

Tabla 5. Propiedades químicas y farmacológicas de la fenitoína

Propiedades químicas	
Solubilidad en agua	Limitada (32 mg/L)
Peso molecular	352.26
pKa	8.3
Punto de fusión	295-298°C
Dosis	
Dosis recomendada para adultos	>300 mg/día
Dosis recomendada para niños	5-10 mg/Kg/día
Monitorización	
Muestra	Suero, plasma
Concentración efectiva	10-20 µg/mL
Concentración tóxica	>20 µg/mL
Metodología	Inmunoensayo, HPLC
Propiedades farmacocinéticas	
Porcentaje de absorción (vía oral)	70-90%
Tiempo de concentración máxima	1.5-3.0 h, liberación prolongada 4-12 h
Unión a proteínas	87-93%, albumina
Volumen de distribución	0.5-0.8 L/Kg
Vida medio, adultos	12-36 h
Tiempo hasta el estado estacionario, adultos	5-7 d
Vida media, niños	7-29 h
Tiempo hasta el estado estacionario, niños	

		2-5 d (dependiendo de la dosis, promedio 14 h)	
Excreción, orina			
	% Excreción	Activa	Detectada en sangre
Inalterada	1-5	Sí	Sí
Parahidroxifenilhidantoina (HPPH), libre y conjugada	60-80	No	Sí

Las enzimas hepáticas microsomales, especialmente el citocromo P450 (CYP) 2C9 y 2C19, metabolizan ampliamente a la fenitoína (>95%). La parahidroxifenilhidantoina (HPPH), el principal metabolito, representa hasta el 80% del metabolismo y es inactivo. La eliminación de primer orden se presenta cuando los niveles plasmáticos del fármaco son menores a 10 µg/mL. Sin embargo, cuando la concentración >10 µg/mL, el metabolismo hepático se satura y la eliminación pasa a ser de orden cero (dependiente de la dosis). De esta manera, la dosis y la concentración del fármaco influyen directamente con el aumento de la vida media plasmática. Para mantener los niveles terapéuticos en niños son necesarias dosis más altas, ya que el metabolismo pediátrico suele ser más rápido que en adultos. Ya que el CYP2C9 presenta una tasa metabólica alta (80-90%), se ha reportado que los polimorfismos del CYP2C9 dan lugar a una reducción del metabolismo del fármaco, presentándose una elevación en los niveles séricos. Por ejemplo, se ha reportado que dos polimorfismos, CYP2C9*2 y CYP2C9*3, presentan una disminución en la actividad enzimática, siendo este último el que presenta una disminución más marcada. En la raza caucásica, la variante CYP2C9*2 es la más frecuente, presentándose entre un 10-13% de la población, mientras que el CYP2C9*3 se presenta tan solo en un 5-9%. En cuanto a la población africana y asiática, la presencia de estos dos alelos es menor a la observada en los caucásicos. En la población india la variante CYP2C9*2 oscila entre 3-5% mientras que la CYP2C9*3 se

presenta en 4-8% de los individuos. Por otra parte, en japoneses y chinos el alelo CYP2C9*2 no ha sido detectado. De lo anterior, se ha demostrado que las personas que presentan algún polimorfismo en CYP2C9 presentan un mayor riesgo de toxicidad causado por la fenitoína (Chaudhary et al., 2016).

Al igual que la CYP2C9, la fenitoína también puede estimular la actividad de las enzimas CYP1A2, CYP2C19 y CYP3A4, estas enzimas también las pueden estimular fármacos como el fenobarbital, la primidona y la carbamazepina. Del mismo modo, la acción de fármacos como el clonazepam, lamotrigina, etosuximida, carbamazepina, oxcarbazepina, topiramato y el ácido valproico pueden verse modificados por la inducción enzimática de CYP por la fenitoína. Además, la fenitoína puede afectar el metabolismo de fármacos como los antidepresivos tricíclicos, antimicrobianos, antipsicóticos, cardiovasculares, inmunosupresores, Warfarina, vitamina D y K y la bilirrubina. El fenobarbital se ha asociado con la reducción en la absorción oral de la fenitoína. Por otra parte, la suspensión en el uso de la fenitoína puede dar lugar al aumento en las concentraciones plasmáticas de otros fármacos que se administren simultáneamente, causando efectos tóxicos (Bourgeois, 2000; Perucca, 2006; Sander, 2004).

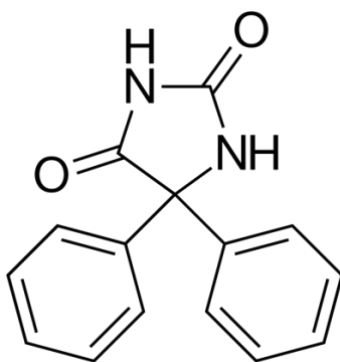


Figura 5. Estructura química de la fenitoína

La fenitoína tiene un rango terapéutico estrecho, una concentración sérica $> 80\mu\text{M}$ se ha relacionado con una toxicidad clínicamente relevante (Praveen-kumar & Desai, 2014). Una vez metabolizada, la fenitoína es excretada por los riñones, en personas con insuficiencia renal suele presentarse una acumulación tóxica debido al padecimiento (Chua, Venketasubramanian, Tjia, & Chan, 2000). Además, en los pacientes que reciben hemodiálisis, la fenitoína no suele eliminarse, ya que se encuentra unida a la albumina

aproximadamente en un 90% (Martin et al., 1977). Por lo general, este tipo de toxicidad no suele estar relacionada con mortandad, sin embargo, se han reportado casos en los que se presentan síntomas neurológico como el nistagmo (Praveen-kumar & Desai, 2014), ataxia (Shanmugarajah et al., 2018) y coma (Craig, 2005). También se han reportado casos raros, en los que la aplicación intravenosa de fenitoína puede generar complicaciones por el síndrome del guante morado, reacción que afecta a los tejidos blandos que se caracterizan por una gran hinchazón, pudiendo causar oclusión ocular e incluso necrosis, pudiendo llevar a la amputación (Garbovsky, Drumheller, & Perrone, 2015; Jain, Nagpal, Kumar, Prakash, & Handa, 2015; Okogbaa, Onor, Arije, Harris, & Lillis, 2015).

Entre los factores que más se relacionan con la toxicidad de la fenitoína se encuentran: un mal uso o ajuste de la dosis, la interacción con otros fármacos y cambios en la fisiología del paciente (Kang et al., 2013; Srinivasan, Wyawahare, Mathen, & Subrahmanyam, 2015). Los principales síntomas que se presentan durante la intoxicación por fenitoína son: náuseas, ataxia, nistagmo e incluso coma (Craig, 2005). Se relacionan en menor medida la hipotensión y las arritmias asociadas al uso de este fármaco. La fenitoína es considerada una sustancia de toxicidad moderada y la probabilidad de muerte a causa de una intoxicación por este fármaco es muy baja (S. H. Imam et al., 2014).

Se han realizado ensayos in vitro en varias cepas de *Salmonella typhimurium* para determinar la mutagenicidad de la fenitoína y de su principal metabolito, la 5-(4-hidroxifenil)-5-fenilhidantoina, utilizando la prueba de Ames (Léonard, de Meester, Fabry, de Saint-Georges, & Dumont, 1984; Riedel & Obe, 1984; Sezzano, Raimondi, Arboix, & Pantarotto, 1982). De los estudios mencionados anteriormente se concluyó que la fenitoína no presenta propiedades mutagénicas. Además, se han realizado algunos experimentos en animales de laboratorio, de los cuales no se han evidenciado pruebas de carcinogenicidad por parte del fármaco (Chhabra et al., 1994; Jang et al., 1987; Maeda et al., 1988). Se han reportado neoplasias hepatocelulares en ratones expuestos a la fenitoína, sin embargo, presentan poca o nula relevancia para los seres humanos. En la actualidad no se ha encontrado una relación directa entre el uso de la fenitoína y el

cáncer de hígado (Dethloff, Graziano, Goldenthal, Gough, & de la Iglesia, 1996; Friedman et al., 2009; Singh, Driever, & Sander, 2005).

En cuanto a la teratogenicidad, se ha relacionado a la fenitoína con un aumento en el riesgo de presentarse malformaciones congénitas (Danielsson et al., 2005; Eroğlu, Gökçil, Bek, Ulaş, & Odabaşı, 2008). Se cree que el riesgo alto de presentar malformaciones congénitas está asociado directamente con la actividad antiepiléptica del fármaco. Demostrándose lo anterior en un buen número de estudios realizados (Azzato et al., 2010; Kaplan & Demir, 2021; Ritchie, Oakes, Farrell, Ababneh, & Howe, 2019; Tomson et al., 2018). Sin embargo, los riesgos asociados tienen un carácter multifactorial e incluyen la predisposición genética del individuo (Canger et al., 1999).

En general, para contrarrestar la toxicidad causada por la fenitoína se requiere un cuidado individualizado del paciente. Se deben monitorizar constantemente los signos y funciones vitales del paciente, controlando las náuseas y el vómito. También se deben tener cuidados de apoyo, con el fin de prevenir lesiones que puedan ser debidas a la confusión o ataxia. Cabe señalar que no existe un antídoto específico para la intoxicación por fenitoína, y una eliminación acelerada o lavado gástrico no han ayudado en disminuir el tiempo de recuperación del paciente (L. Zhang et al., 2018).

La fenitoína es un fármaco antiepiléptico ampliamente utilizado en la práctica clínica desde hace unos 80 años. Se utiliza principalmente para el tratamiento de las convulsiones tónico-clónicas y de inicio parcial (Abou-Khalil, 2016; Patocka, Wu, Nepovimova, & Kuca, 2020). La PHE se une al estado inactivado del canal de Na⁺ y prolonga así el periodo refractario neuronal, teniendo un efecto inhibitor altamente selectivo en el área motora de la corteza cerebral. Además, se cree que la fenitoína ejerce su efecto antiepiléptico estabilizando la función de las membranas de las células cerebrales y aumentando los niveles de neurotransmisores inhibidores (serotonina (5-HT) y ácido γ-aminobutírico (GABA)) en el cerebro. (Keppel Hesselink, 2017).

Además, la seguridad y eficacia de la PHE se ha evaluado en un gran número de trastornos diferentes, explorados en más de 100 trastornos diferentes (Kopsky & Hesselink, 2017), desde el trastorno bipolar (Patocka et al., 2020), la curación de heridas (Keppel Hesselink, 2018; Kumar, Vasudeva, Rao, & Naidu, 2020) espasmos bronquiales inducidos por el asma bronquial y la bronquitis asmática crónica (L. Zhang et al., 2018),

dolor neuropático (Hall et al., 2020), antiarrítmico (Zhang et al., 2018), para reducir la migración y la invasión en el cáncer de mama metastásico (Kalaiarasi, Sangeetha, Pavan, & Kumaradhas, 2018) y en la neuritis óptica (Raftopoulos et al., 2016).

En los protocolos convencionales de tratamiento del estado epiléptico, la PHE se considera el fármaco de primera línea cuando el paciente no responde a las benzodiacepinas, aproximadamente el 40-60% de los casos (Brigo, Bragazzi, Lattanzi, Nardone, & Trinkka, 2018; L. Li et al., 2020; D. Mishra et al., 2014; Nalisetty et al., 2020). Aunque en los últimos años se han aprobado nuevos FAE para el tratamiento del estado epiléptico, la fenitoína sigue siendo el fármaco de primera línea en muchos países, incluida Tailandia (DeMott, Slocum, Gottlieb, & Peksa, 2020; Soontornpun et al., 2020). En Estados Unidos, según la encuesta anual del Panel de Gasto Médico realizada por la Agencia para la Investigación y la Calidad de la Atención Sanitaria (AHRQ), la PHE se encuentra entre los 300 principales medicamentos de 2018, ocupando el puesto 269. Según esta encuesta, las prescripciones en 2018 fueron aproximadamente 1.643.497 (Kane, 2018). Según estos datos, la PHE se consume ampliamente en el mundo, contribuyendo además a la introducción de este FAE en las masas de agua a través de los vertidos de los efluentes municipales, industriales y hospitalarios.

Varios estudios informan de la presencia de PHE en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), efluentes hospitalarios, aguas superficiales e incluso agua potable. Estas concentraciones oscilan entre 1.1 y 2375 ng/L en diferentes matrices acuáticas, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Ocurrencia de PHE en diversas matrices acuáticas

País	Muestra	Concentración (ng/L)	Referencia
Estados Unidos	Aguas residuales	287-402	(Vanderford & Snyder, 2006)
Corea	Agua superficial	1.1-8.9	(Kim, Cho, Kim, Vanderford, & Snyder, 2007)
Japón	Río	4	(Hoshina, Horiyama, Matsunaga, & Haginaka, 2009)
Corea	Agua superficial	1.8-54	(Yoon, Ryu, Oh, Choi, & Snyder, 2010)
España	Agua potable	10	(Huerta-Fontela, Galceran, & Ventura, 2011)

Estados Unidos	Agua superficial	150	(Laws, Dickenson, Johnson, Snyder, & Drewes, 2011)
Arabia Saudita	Aguas residuales	<20-440	(Alidina et al., 2014)
Estados Unidos	Agua de pozo	66	(Schaidler, Rudel, Ackerman, Dunagan, & Brody, 2014)
Estados Unidos	Efluente hospitalario	60-100	(T. S. Oliveira et al., 2015)
Japón	Ríos y agua potable	3.1-23	(Simazaki et al., 2015)
Estados Unidos	Cuencas hidrológicas urbanas	145	(Bai et al., 2018)
España	Aguas residuales	111-2375	(Mijangos et al., 2018)
España	Estuario	6-1401	(Mijangos et al., 2018)
Sri Lanka	Agua superficial	6.4-79	(Guruge et al., 2019)
China	Agua potable	1.93	(M. Liu, Yin, & Wu, 2019)

Los estudios reportados en la literatura sobre los efectos tóxicos del PHE en organismos acuáticos son escasos. Se evaluó la toxicidad del PHE en *Lepomis gibbosus*, expuesto a 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 µg/L, centrándose en los parámetros de estrés oxidativo en los tejidos hepáticos, digestivos y branquiales. Los resultados mostraron respuestas adaptativas en las actividades de las enzimas catalasa y glutatión S-transferasa en el hígado de los organismos expuestos en respuesta al estado de estrés oxidativo (Brandão et al., 2013). Para evaluar los efectos de la PHE en la actividad locomotora y la trigmotaxis de las larvas de pez cebr a los 5 días post-fertilización, las larvas fueron expuestas a 1,4,20, 100 y 500 µM. Además, se investigó la influencia de la PHE en las respuestas de las larvas a los estímulos visuales. Los resultados sugieren que el efecto de la PHE sobre la actividad locomotora y la trigmotaxis fue dependiente de la concentración. En condiciones de luz u oscuridad, la exposición a altas concentraciones de PHE causó una disminución significativa de la actividad locomotora y la trigmotaxis, mientras que el tratamiento con dosis bajas aumentó la actividad locomotora (X. Liu et al., 2016). En un estudio realizado por Weigt et al., 2011, se evaluó la teratogenicidad de 10 compuestos (incluyendo PHE) en embriones de pez cebr a expuestos durante 3 días a concentraciones de 31,25, 62,5, 125 y 250 µM. Los valores CL₅₀ y CE₅₀ fueron >250µM

y 386µM respectivamente, con un índice de teratogenicidad >1. Además, los resultados permitieron concluir que los embriones de pez cebra son capaces de activar las sustancias proteratógenas sin necesidad de añadir un sistema de activación metabólica exógena (Weigt et al., 2011). En otro estudio, se evaluó el efecto teratogénico de la PHE en peces cebra expuestos a 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 µM, monitoreando la eclosión y la morfología. Se midió la actividad locomotora en las larvas como parámetro de neurotoxicidad. La exposición de embriones a PHE indujo un retraso en el desarrollo y un efecto teratogénico de manera dependiente de la concentración, reflejado en el tiempo de eclosión y la morfología del embrión (Martinez et al., 2018).

Danio rerio

Originario del sudeste asiático, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en el organismo acuático más utilizado en los laboratorios de todo el mundo (J. De Oliveira et al., 2021). Debido al alto grado de conservación genética en comparación con los mamíferos, el pez cebra se ha convertido en un modelo muy atractivo en diversas áreas de la ciencia como la genética (Carney & Mosimann, 2018; Postlethwait & Braasch, 2020), la biología del desarrollo (Meyers, 2018; Ye & Chen, 2020), la neurociencia (Ahrens, 2019; Freifeld et al., 2017; R. Gerlai, 2019), la biomedicina (Pitchai, Rajaretinam, & Freeman, 2019; Volgin et al., 2019) y la ecotoxicología (Abe et al., 2021; Lee, Green, & Tyler, 2015; Seok et al., 2008; Sun et al., 2020). Además, el pez cebra se ha revelado como un excelente modelo vertebrado para las pruebas de letalidad y teratogenicidad debido a las siguientes ventajas: el mantenimiento de una colonia de peces cebra es sencillo, ocupan poco espacio, son baratos y producen un elevado número de embriones (alta fecundidad), el desarrollo es rápido y puede visualizarse desde la embriogénesis hasta el organismo completo (Kimmel, Ballard, Kimmel, Ullmann, & Schilling, 1995), la toxicidad durante el desarrollo puede evaluarse en poco tiempo, los embriones son ópticamente transparentes, lo que permite realizar ensayos de teratogenicidad de forma muy completa, ya que sus vías de desarrollo están conservadas evolutivamente, lo que hace que el pez cebra sea muy sensible a los compuestos teratogénicos (Raghunath & Perumal, 2018).

Además, su genoma fue completamente secuenciado en 2013, tienen un 70% de homología con los genes humanos y muchos de sus órganos y tejidos son muy similares

a los de los humanos (Collin & Martin, 2017). La morfología de los nervios de *D. rerio* es muy similar a la de otros vertebrados y está conservada evolutivamente. El desarrollo del sistema nervioso es relativamente corto, comienza a las 6 hpf y se completa a las 6 dpf (Cheng et al., 2020). Además, los sistemas de neurotransmisión se conservan entre *D. rerio* y los mamíferos. Todas estas características hacen posible el uso de *D. rerio* como modelo animal para comprender los mecanismos neurotóxicos subyacentes a la exposición a contaminantes ambientales, como los fármacos. El pez cebra se ha utilizado como organismo modelo en toxicología acuática y neurotoxicidad para detectar los efectos tóxicos de diversos contaminantes. (da Silva Santos et al., 2018; Genario et al., 2020; R. Gerlai, 2019; Muthulakshmi, Maharajan, Habibi, Kadirvelu, & Venkataramana, 2018; Zhou et al., 2019)

Estrés oxidativo

En 1985 SIES, definió el estrés oxidativo como "*una alteración del equilibrio prooxidante-antioxidante a favor del primero*", teniendo en cuenta los importantes avances en la biología redox que han dado lugar a la comprensión del papel de la señalización redox, Sies and Jones, 2007 definieron el estrés oxidativo como "*un desequilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes a favor de los oxidantes, lo que conduce a una interrupción de la señalización redox y el control y/o el daño molecular*", en ambas definiciones las especies reactivas de oxígeno y la regulación redox juegan un papel importante durante el desarrollo normal.

La alteración de los procesos celulares y/o moleculares durante el desarrollo fisiológico normal puede provocar toxicidad en forma de teratogénesis o mortalidad. La regulación redox, el plegamiento de las proteínas y la apoptosis desempeñan papeles importantes durante el desarrollo normal, y cuando estos procesos se ven perturbados por tóxicos (endógenos o exógenos) pueden provocar una amplia gama de malformaciones e incluso la muerte (Kupsco & Schlenk, 2015).

El estrés oxidativo es causado por la producción excesiva de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO). El estrés oxidativo está profundamente implicado en el mecanismo de toxicidad de varios fármacos detectados en las masas de agua, amenazando el equilibrio ecológico de la vida acuática (Almeida et al., 2015; Brandão et al., 2013; Cheng et al., 2020; P. Oliveira et al., 2017; C. Yang, Lim, & Song, 2020). En

general, los organismos acuáticos tienen un sistema de defensas enzimáticas para protegerse de la producción excesiva de ROS, y de esta manera mantener un equilibrio fisiológico para la adaptación al medio acuático (P. Wu et al., 2017; C. Yang et al., 2020).

Neurotoxicidad

Los rasgos de comportamiento se han descrito como puntos finales para evaluar los efectos tóxicos de los FAE, ya que estas alteraciones del comportamiento suelen representar una respuesta temprana a los FAE. Además, los estudios de comportamiento son importantes ya que están estrechamente relacionados con la idoneidad individual y la persistencia de la población, y esto nos permite tener una mejor comprensión de los impactos ecológicos de los contaminantes en el medio acuático (H. Chen et al., 2021; Cunha, de Araujo, & Marques, 2017).

Acetilcolinesterasa

La acetilcolina (ACh), como neurotransmisor, es el principal neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático y de las uniones neuromusculares. También se distribuye en el SNC, ayudando a modular la liberación de otros neurotransmisores (GABA), y está asociada a la excitación, la recompensa, el aprendizaje y la memoria. La ACh difiere de otros neurotransmisores en su mecanismo de captación/recaptación, ya que el metabolismo de la ACh está controlado por la acetilcolinesterasa (AChE), formando acetato y colina (Horzmann & Freeman, 2016; Picciotto, Higley, & Mineur, 2012). La AChE juega un papel importante en la homeostasis cerebral, ya que al regular los niveles de ACh influye en la excitabilidad neuronal y en la liberación de otros neurotransmisores (Bernardo et al., 2019). La AChE ha sido reconocida como un biomarcador central de neurotoxicidad (Métais et al., 2019). Se ha observado la inducción e inhibición de su actividad en estudios de laboratorio y de campo en organismos expuestos a pesticidas, metales, hidrocarburos aromáticos policíclicos y productos farmacéuticos (Pullaguri et al., 2021; Ramesh et al., 2020; Severo et al., 2020; S. Xia et al., 2021).

Justificación

Los seres humanos necesitan prioritariamente disponer de agua con la calidad apta para garantizar su salud y además considerar la sostenibilidad del recurso para asegurar también esa calidad para las generaciones futuras. La protección del medio ambiente es uno de los principales retos de la sociedad actual. Los medicamentos poseen mecanismos de acción específicos sobre los animales y el ser humano a los que son destinados pero esto no impide descartar unos posibles efectos sobre organismos no diana (flora y fauna) presentes en el ambiente y que pueden ser sensibles al modo de acción de estos fármacos. Por lo anterior, son necesarios estudios actualizados sobre sus efectos ecotoxicológicos que los fármacos puedan producir . Al día de hoy no existe en nuestro país una legislación que regule los niveles máximos de las concentraciones de medicamentos en el agua. Las estaciones de depuración de aguas residuales no cuentan con la tecnología adecuada para su eliminación y ya son muy numerosos los estudios tanto en nuestro país como a nivel mundial que evidencian la presencia de este tipo de contaminantes en los cuerpos de agua. También se desconoce el efecto de exposiciones crónicas a bajas dosis de estas sustancias sobre los organismos acuáticos y especialmente cuál puede ser su efecto sobre la salud humana.

La fenitoína es un fármaco anticonvulsivo que se usa comúnmente en el tratamiento de las convulsiones de gran mal asociadas con la epilepsia. Es uno de los medicamentos más frecuentemente detectados en el agua potable en estudios realizados en Estados Unidos. Los posibles efectos ecológicos adversos de la fenitoína sobre los organismos acuáticos siguen siendo en gran parte desconocidos. En general, los compuestos farmacéuticos y sus metabolitos pueden estimular la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y causar daño oxidativo a los organismos acuáticos, como lo han demostrado diversos estudios a nivel mundial. Las drogas farmacéuticas neuroactivas, como la fenitoína, ejercen su efecto al alterar y modular las funciones del sistema nervioso. Algunos de estos compuestos, como los antidepresivos y los antiepilépticos, son de importancia ambiental, debido a que las dianas farmacológicas se conservan evolutivamente (receptores y biomoléculas celulares), además de que se ha demostrado que este tipo de productos farmacéuticos en la naturaleza provocan efectos adversos,

como la disfunción hormonal y la interrupción de la neurotransmisión, lo cual puede producir alteraciones en el comportamiento. A pesar del uso común de la fenitoína en la práctica clínica y también en estudios experimentales, hay relativamente pocos informes de sus efectos ecotoxicológicos en peces y organismos acuáticos en general. Es por ello que ésta investigación tendrá por objetivo evaluar el potencial tóxico de la fenitoína a través de biomarcadores como: estrés oxidativo, embriotoxicidad, teratogénesis y neurotoxicidad en *Danio rerio* para contribuir a ampliar el conocimiento sobre los efectos biológicos de contaminantes en matrices acuáticas.

Hipótesis

La exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de fenitoína inducirá estrés oxidativo así como embriotoxicidad, teratogénesis y neurotoxicidad en el pez cebra (*Danio rerio*).

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la toxicidad inducida por concentraciones ambientalmente relevantes de fenitoína en el pez cebra (*Danio rerio*)

Objetivos específicos

- Determinar los biomarcadores de daño celular así como de enzimas antioxidantes en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos a fenitoína.
- Evaluar la embriotoxicidad inducida por la fenitoína en *Danio rerio*.
- Determinar el índice teratogénico (CL₅₀/CE₅₀)
- Identificar y cuantificar las malformaciones inducidas por la fenitoína en embriones de pez cebra (*Danio rerio*)
- Evaluar los efectos de la exposición a fenitoína sobre los parámetros de comportamiento en el pez cebra adulto
- Determinar los biomarcadores de estrés oxidativo y los niveles de AChE en el cerebro del pez cebra adulto.

Materiales y métodos

Reactivos

La PHE (pureza >99%, número CAS 57-41-0) se compró a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La solución madre se preparó con 10 mg de PHE disueltos en DMSO (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich) en 1 L de agua desionizada. Las otras concentraciones de PHE probadas se prepararon a partir de esta solución madre, la concentración final de DMSO en las soluciones de exposición fue del 0.05% (v/v). A menos que se indique lo contrario, todos los demás reactivos eran de grado analítico y se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Organismos de ensayo y sistemas de exposición

Los adultos de *D. rerio* de seis meses de edad (cepa AB) se mantuvieron en acuarios de vidrio de 50 L suministrados con agua esterilizada por UV y declorada (1 pez/L). El agua de los acuarios se renovaba cada dos días. Los organismos se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 14:10 h y se alimentaron con un alimento comercial a base de espirulina (Ocean Nutrition, EE.UU.) dos veces al día y larvas de nauplios de *Artemia sp.* una vez al día. Además, la temperatura del agua se mantuvo siempre constante ($27 \pm 1^\circ\text{C}$). En todos los acuarios se midió la conductividad (300-1500 μS), el pH (7,5), el cloro ($25\text{-}50 \text{ mgL}^{-1}$), el nitrato ($< 50 \text{ mgL}^{-1}$), el nitrito ($< 0.1 \text{ mgL}^{-1}$), el amoníaco ($< 0.02 \text{ mgL}^{-1}$), el oxígeno disuelto ($> 6.0 \text{ mgL}^{-1}$) y la salinidad ($0.5\text{-}1 \text{ gL}^{-1}$).

Para las pruebas de embriotoxicidad y teratogénesis, los embriones se obtuvieron a partir del apareamiento natural. Para la recogida de ovocitos, los peces fueron transferidos a una cámara de desove la tarde anterior al día de inicio de los experimentos, en una proporción de 2 hembras: 1 macho. Se dejó que los peces se apareasen y desovasen, y los ovocitos se recogieron a la mañana siguiente en platos de cristal transparentes 1 h después del desove.

Para la exposición de los peces que se usaron en las pruebas de neurotoxicidad, se asignaron veinticuatro adultos de *D. rerio* en cuatro acuarios de 6L de capacidad. Cada acuario contenía seis peces y representaba cada una de las concentraciones de PHE probadas en este estudio (0, 25, 282 y 1500 ngL^{-1}). La exposición duró 96 h, y el medio de exposición se renovó cada 24 h. La temperatura, así como los ciclos de luz/oscuridad, fueron los mismos que en el mantenimiento de los peces.

Protocolo de exposición en embriones de *D. rerio*

En el presente estudio, se siguió la directriz de ensayo 236 de la OECD (OECD, 2013), un ensayo de toxicidad aguda en embriones de peces (FET) con peces cebra (*D. rerio*). Las concentraciones probadas de PHE (1500, 1400, 100, 500, 440, 287, 150, 78, 54 y 25 ngL⁻¹) fueron seleccionadas por su relevancia ambiental (Tabla 5). Además del grupo de control, se estableció un sistema con 0.05% de DMSO. Los ovocitos viables se seleccionaron con la ayuda de un estereomicroscopio y se incubaron en placas de 24 pocillos. Los oocitos se incubaron individualmente en 2 mL de medio, formando lotes de 24 oocitos para cada concentración probada, cada concentración se probó por triplicado. Las microplacas se colocaron en una incubadora a 28 ± 1°C durante cuatro días, con ciclos de luz/oscuridad de 14:10 h. Para detectar alteraciones en el desarrollo embrionario y/o la muerte de los embriones debido a la PHE, se realizaron observaciones estereomicroscópicas a las 12, 24, 48, 48, 72 y 96 hpf.

Tras 96 hpf de exposición, se contaron los embriones vivos, muertos y malformados. Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de regresión lineal de máxima verosimilitud para calcular la concentración letal media (CL₅₀) y la concentración efectiva de malformación (CE₅₀) con sus intervalos de confianza del 95% (p < 0.05). Con estos datos, se calculó el índice teratogénico (IT) utilizando la relación CL₅₀/CE₅₀.

Evaluación del desarrollo embrionario

Basándose en la morfología visible de los embriones, la evaluación de las anomalías estructurales y el retraso en el desarrollo de los embriones expuestos a la PHE se llevó a cabo mediante la comparación con un embrión de referencia, según Kimmel et al., 1995. Los factores evaluados fueron: el desarrollo de la cola, el desarrollo de los ojos, la formación de somitas, el movimiento, la circulación sanguínea, la pigmentación de la cabeza y el cuerpo, la pigmentación de la cola, la aparición de las aletas pectorales, la protuberancia de la boca y la eclosión; a todos ellos se les asignó un valor según Hermsen et al., 2011, y no se puntuó una unidad por cada anomalía o retraso en cualquiera de las características a evaluar.

Determinación del estrés oxidativo en embriones de *D. rerio*

Se probaron diez concentraciones de PHE ambientalmente relevantes (1500, 1400, 100, 500, 440, 287, 150, 78, 54 y 25 ngL⁻¹), cada una de ellas con 1600 embriones de *D. rerio*

(4hpf) divididos en ocho placas de Petri de vidrio (30 mL de solución), para asegurar la supervivencia de suficientes larvas en cada ensayo. Los grupos de control (solución de control y DMSO al 0.05%) contenían 900 embriones (4hpf) cada uno. Se realizaron tres réplicas para cada grupo. Durante el periodo de exposición, todos los tratamientos se mantuvieron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperiodos de 14 h de luz y 10 h de oscuridad. La mitad de la solución de cada tratamiento se renovó diariamente para mantener la concentración adecuada de PHE. Después de 72 y 96 h de exposición a PHE, se homogeneizaron 600 embriones en 1 mL de solución amortiguadora de fosfato fría (PBS, pH 7.4). El homogeneizado se separó en dos tubos y se procedió de la siguiente manera: **tubo 1**, 300 μL de homogeneizado y 300 μL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se centrifugó a 11495g a 4°C durante 15 min, el precipitado se utilizó para determinar el contenido de proteínas carboniladas (PCC), y el sobrenadante se utilizó para determinar el nivel de lipoperoxidación (LPX) y el contenido de hidroperóxidos (HPC); **tubo 2**, se centrifugaron 700 μL del homogeneizado durante 15 min a 12500g a 4°C , el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y el contenido total de proteínas. El nivel de cada parámetro bioquímico se normalizó con respecto a su contenido en proteínas.

Evaluación de la oxidación celular

El nivel de peroxidación lipídica se evaluó siguiendo los procedimientos reportados por Buege and Aust, 1978. Se mezclaron 50 μL de sobrenadante del tubo 1, 450 μL de solución de Tris-HCl (150 mM) y 1 mL de solución de ácido tricloroacético-ácido tiobarbitúrico (TCA-TCB) en tubos de vidrio. El choque térmico se produjo sumergiendo los tubos en agua hirviendo. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37°C . A continuación se centrifugaron a 3500g durante 10 minutos. La absorbancia se midió a 535 nm.

El contenido de hidroperóxidos se evaluó con la técnica de Jiang et al., 1992, se mezclaron 100 μL del sobrenadante del tubo 1 y 900 μL de la mezcla de reacción (10 mL de la solución A ($\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$) y 20 mL de la solución B (butilato de deshidroxitolueno + naranja de xilenol) en un tubo, se dejó reposar durante 60 min a temperatura ambiente y se protegió de la luz. La absorbancia se midió a 560 nm.

El nivel de carbonilo proteico se cuantificó mediante el método descrito por (Levine, Williams, Stadtman, & Shacter, 1994) modificado por (Burcham, 2007; Parvez & Raisuddin, 2005). Rápidamente, se mezcló el precipitado del tubo 1 y 150 mL de dinitrofenilhidrazina (DNPH)/HCl 10 mM y se dejó reposar durante una hora en la oscuridad a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se añadieron 500 µL de ATC (20%), los tubos se incubaron a 4°C durante 15 min antes de centrifugar a 11000g durante 5 min. El sobrenadante se disechó y el botón se lavó con una solución 1:1 de etanol: acetato de etilo para obtener un botón blanco disuelto en 1 mL de guanidina 6 M y se incubó durante 30 min a 37°C. La absorbancia se midió a 366 nm. En todos los ensayos se utilizó un blanco de PBS con el mismo tratamiento que las muestras.

Ensayos de actividad antioxidante

La actividad de la SOD en los embriones se evaluó siguiendo el protocolo descrito por Misra and Fridovich, 1972. Para el ensayo, se añadieron 40 µL del sobrenadante del tubo 2 directamente en la celda, 260 µL de tampón carbonato y 200 µL de adrenalina (30 nM), se midió la absorbancia a 480 nm (30 s y 5 min).

La actividad de CAT se midió con el método de Radi et al., 1991. Se colocaron 30 µL de sobrenadante del tubo 2 directamente en la celda, se añadieron 420 µL de tampón de aislamiento (0.3 M de sacarosa, 1 mM de EDTA, 5 mM de HEPES y 5 mM de KH₂PO₄) y 300 µL de peróxido de hidrógeno (20 mM), la absorbancia se midió a 240 nm (0 y 60 s).

La actividad de la GPx en los embriones se determinó mediante la técnica descrita por Flohé and Günzler, 1984. Se colocaron 100 µL del sobrenadante del tubo 2 directamente en la celda, se añadieron 290 µL de tampón de reacción, 100 µL de peróxido de hidrógeno (20 mM) y 12 µL de glutatión reductasa, se midió la absorbancia a 340 nm (0 y 60 s). En todos los ensayos se utilizó un blanco de PBS con el mismo tratamiento que las muestras.

Determinación del contenido total de proteínas

El contenido total de proteínas se determinó espectrofotométricamente por el método descrito por Bradford, 1976. Se tomaron 13 µL de sobrenadante del tubo 2 y se mezclaron con 75 µL de agua destilada y 1.25 mL de reactivo de Bradford. Esta mezcla se homogeneizó en un Vortex durante un minuto, se protegió de la luz y se incubó a

temperatura ambiente durante 5 min. La absorbancia se midió a 595 nm, utilizando un blanco de PBS con el mismo tratamiento que las muestras. Las absorbancias obtenidas se extrapolaron a una curva estándar (albúmina de suero bovino) para determinar la concentración total de proteínas.

Determinación de la fenitoína

El agua extraída diariamente para la renovación del medio de exposición se almacenó en frascos de vidrio ámbar. En ese momento, se ajustó el pH a 2 con ácido clorhídrico concentrado para su conservación y se almacenó a 4°C hasta la extracción. No se dejaron pasar más de 14 días desde la recogida hasta la extracción. Se recogieron muestras de 0, 12, 24, 48, 72, a 96 h de exposición. La determinación de PHE se realizó de acuerdo con la metodología descrita por (Ahrer, Scherwenk, & Buchberger, 2001). Se utilizó un sistema HPLC HP 110 equipado con un automuestreador HP 1050 (Agilent, Palo Alto, CA) para las separaciones cromatográficas líquidas. Se utilizó un flujo de 150 mL/min y un gradiente ternario de solución de acetato de amonio 20 mM ajustada a pH 5.5 con ácido acético 1 M (A), metanol (B) y agua (C) en diferentes proporciones (10:15:75, 10:50:40 y 10:90:0) de 0 a 20 min. Se utilizó un sistema cuadrupolar HP 5989B (Agilent) equipado con un hexapolo de radiofrecuencia (Analytica of Bradford, CT) que utilizaba una interfaz de ionización por electrospray HP 59987A asistida por aire (Agilent). El flujo de gas de secado fue de 7 L/min. Se utilizó nitrógeno 5.0 para la nebulización a una presión de 550 kPa.

Respuesta integrada de bioindicadores (IBR)

Los biomarcadores medidos en embriones de *D. rerio* se utilizaron para calcular el Índice de Respuesta Integrada de Bioindicadores (IBR). En el presente estudio, los biomarcadores utilizados fueron SOD, CAT, GPx, LPX, PCC y HCP. Según Beliaeff and Burgeot, 2002, el índice IBR fue obtenido y modificado por (Sanchez, Burgeot, & Porcher, 2013), el cual fue representado en gráficos de estrella. El procedimiento fue el siguiente: se realizó una comparación entre los datos individuales de cada biomarcador (X_i) contra los datos de referencia (X_0), y se realizó una transformación logarítmica para reducir la varianza.

$$Y_i = \log (X_i/X_0)$$

Para Y_i , se calcularon la media (μ) y la desviación estándar (σ), y

y se realizó la estandarización.

$$Z_i = (Y_i - \mu)/\sigma$$

Se definió un índice de desviación del biomarcador (A) como la media de la respuesta estandarizada del biomarcador (Z_i) y la media de los datos del biomarcador de referencia (Z_0).

$$A = Z_i - Z_0$$

Finalmente, para obtener el índice IBR, se sumó el valor absoluto de los parámetros A calculados para cada biomarcador.

$$IBR = \sum |A|$$

Análisis estadístico

La CL_{50} y la CE_{50} se calcularon mediante el análisis PROBIT (Programa de análisis EPA v 1.5). La prueba exacta de Fisher analizó los datos sobre las alteraciones del desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos; se aceptó la significación cuando $p < 0.05$, utilizando el software SPSS v9 (SPSS, Chicago, IL). Los datos sobre el estrés oxidativo se examinaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Las diferencias entre las medias se examinaron mediante una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer con un límite de confianza del 95%.

Evaluación de los parámetros conductuales (Novel Tank Test)

El Novel Tank Test (NTT), utilizado para evaluar la ansiedad y la actividad locomotora, se llevó a cabo según lo descrito por (Cachat et al., 2013; Faria et al., 2018) con pequeñas modificaciones. Los experimentos se llevaron a cabo en una sala de comportamiento aislada e insonorizada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Una hora antes del inicio de las pruebas, los peces (proporción 50:50 de hembras y machos) fueron llevados a la sala de comportamiento para que pudieran aclimatarse al nuevo entorno. La NTT se realizó en tanques experimentales de 20 cm de largo X 20 cm de ancho X 25 cm de alto, que contenían 7L de agua a una temperatura de 28°C . La prueba estándar se realizó grabando en vídeo (formato MPEG-4) a los peces expuestos a PHE y a los de control durante 6 minutos. Tras la grabación, cada vídeo se analizó con el software ToxTrac versión 2.95 Hotfix. El tanque experimental se dividió en dos zonas virtuales horizontales iguales. Para cada prueba, se determinó la distancia total recorrida (cm), la distancia que los peces recorrieron en la parte superior e inferior del tanque (cm), la latencia (s), el

número de transiciones, el tiempo de permanencia en la parte superior e inferior (s) y el tiempo de congelación en la parte superior e inferior. Todos los experimentos de comportamiento se realizaron entre las 8:00 y las 13:00 horas y en días diferentes.

Determinación del estrés oxidativo

Inmediatamente después de la NTT, se realizó la eutanasia de los peces siguiendo el método de choque hipotérmico (2-4°C). Una vez que los peces se inmovilizaron debido al choque hipotérmico, se extrajeron los cerebros de todos los peces y se depositaron en tubos Eppendorf con (PBS pH 7.4). Para cada concentración de PHE (0, 25, 282 y 1500 ngL⁻¹), se obtuvieron dos tubos Eppendorf, cada uno con tres cerebros de pez cebra, que se utilizaron para evaluar los biomarcadores de estrés oxidativo y la actividad de la AChE. En el caso del tubo utilizado para el estrés oxidativo, los cerebros se homogeneizaron en 1 mL de PBS, y el contenido se dividió en dos tubos Eppendorf. El tubo 1 contenía 300 µL de homogeneizado y la misma cantidad de ácido tricloroacético al 20%. Por otra parte, el tubo 2 contenía 700 µL del homogeneizado. A continuación, ambos tubos se centrifugaron a 11495 y 12500 rpm durante 15 minutos, respectivamente, y el sobrenadante se utilizó para evaluar toda la batería de biomarcadores de estrés oxidativo. El nivel de cada parámetro bioquímico se normalizó con respecto a su contenido en proteínas, que se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para medir el nivel de peroxidación lipídica, se siguió el procedimiento descrito por Buege y Aust, 1978. En consecuencia, se midió la absorbancia a 535 nm, y el resultado se expresó como nM de malondialdehído (MDA) utilizando el MEC de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El contenido de hidroperóxido se obtuvo siguiendo la metodología de Jiang et al., 1992. Se midió la absorbancia a 560 nm, y el resultado se expresó como nM de hidroperóxido de cumeno (CHP)/mg de peso húmedo de la proteína. El nivel de carbonilo proteico se midió a 366 nm utilizando el protocolo descrito por Levine et al., 1994 con modificaciones hechas por Burcham, 2007; Parvez y Raisuddin, 2005. Así, la absorbancia se midió a 366 nm, y los resultados se expresaron como nM de carbonilos reactivos/mg de tejido húmedo proteico. La actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) en el cerebro se determinó mediante la metodología descrita por Misra y Fridovich, 1972. Midiéndose la absorbancia a 480 nm (30 s y 5 min), y los resultados se expresaron como U SOD/mg proteína tejido húmedo. Para determinar la actividad enzimática de la catalasa (CAT), se siguió el

procedimiento descrito por Radi et al., 1991. Se midió la absorbancia a 0 y 60 segundos a 240 nm, y el resultado se expresó como $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ proteína tejido húmedo. Finalmente, la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) se determinó mediante Flohé y Günzler, 1984. Para ello, se midió la absorbancia a 340 nm a los 0 y 60 segundos y los resultados se expresaron como UI/mg de proteína en peso húmedo. En todos los ensayos se utilizó un blanco de PBS con el mismo tratamiento que las muestras. Las muestras de cada concentración se analizaron tres veces.

Determinación de niveles de AChE en el cerebro de D. rerio

Los cerebros extraídos para la evaluación de la actividad de la AChE también se homogeneizaron en 1 mL de PBS. Se utilizó acetiltiocolina (ASCh) como sustrato para determinar la actividad de la AChE. Según el método descrito por (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961), el producto de conjugación entre el ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y la tiocolina (producto de degradación de la ASCh) se midió a 414 nm durante 6 min a intervalos de 30 s. Para la determinación de la enzima, se utilizó ACSCh (0.8 mM) en soluciones de ensayo de 1.5 mL con 100 nM de tampón de fosfato (pH 7.5) y DTNB (1.0 mM). Se determinó previamente la concentración de proteínas (Bradford, 1976) y la linealidad de la absorbancia con respecto al tiempo. La actividad de la AChE se expresó como μM de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína. Las muestras de cada una de las concentraciones se analizaron tres veces.

Determinación de la PHE en el agua y en el cerebro del pez cebra

Para la determinación de PHE en el agua se siguió la metodología descrita por Ahrer et al., 2001. Las concentraciones de PHE en el medio de exposición se midieron al principio del ensayo (0 h) y después de 96 h de exposición. Una muestra de agua (20 mL para cada grupo) se acidificó con ácido clorhídrico concentrado. Se extrajo 1 mL a la vez de la muestra pretratada mediante agitación mecánica con n-hexano/acetato de etilo 1:1 durante un minuto, repitiendo este procedimiento dos veces. Posteriormente, la fase orgánica se evaporó bajo una corriente de gas nitrógeno y el residuo se sometió a un procedimiento de derivatización para su posterior análisis por HPLC. Las muestras de agua se analizaron por triplicado.

La concentración de PHE en el cerebro del pez cebra se determinó según el método descrito por Pieróg et al., 2021 con ligeras modificaciones. El cerebro del pez cebra se

homogeneizó en una solución 2:1 de agua y metanol durante 20 s utilizando un homogeneizador (Ultra-turrax T25, IKA, Alemania) a 10.000 rpm. El homogeneizado se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm (Centurion Scientific K241R, Reino Unido). El sobrenadante (10 μ L) se inyectó directamente en la columna para el análisis por HPLC. Los análisis se realizaron con un sistema HPLC Agilent 1260 acoplado a un MS API 5500 Qtrap con una fuente de pulverización de iones Turbo V. La separación se realizó con una columna Xbridge C18 (50 mm x 3,0 mm, tamaño de partícula 3,5 μ m). La fase móvil consistió en acetonitrilo y agua; el acetonitrilo se mezcló con tampón dihidrógeno fosfato de potasio 50 nM (pH 3) en una proporción (v/v) de 40:60. Los análisis cromatográficos se realizaron a 21°C y a una longitud de onda de 214 nm. Las muestras se eluyeron a un flujo de 100 μ Lmin⁻¹, y el volumen de inyección fue de 10 μ L. El control del instrumento, la adquisición de datos y el procesamiento de datos se realizaron con el software Analyst 1.6. No se observaron interferencias en los cromatogramas, lo que indica una alta selectividad del método desarrollado. Las concentraciones de PHE se expresaron en ng g⁻¹ de tejido. Utilizando las concentraciones de PHE en las muestras de cerebro y en el agua, se evaluó la bioconcentración de PHE en el cerebro del pez cebra utilizando el factor de bioconcentración (FBC), que se define mediante la siguiente fórmula $FBC = C_b/C_w$, donde C_b es la concentración de PHE en el cerebro y C_w es la concentración en el agua. Las muestras de cerebro se analizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico Sigma plot 12.5 (Sigma Stat) para el análisis estadístico de los datos. Se analizó la normalidad de los datos de cada biomarcador con la prueba de Shapiro-Wilk. Una vez verificada la normalidad, se realizó un ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc Student Newman Keuls. Los resultados se presentan como media \pm SEM. Además, se realizó una correlación de Pearson entre los puntos finales de comportamiento y los otros biomarcadores utilizando el software R. Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significación de 0.05.

Resultados

Toxicidad en el desarrollo y evaluación embrionaria

Se evaluó la toxicidad de la PHE de 12 a 96 horas después de la fecundación en embriones de *D. rerio* a concentraciones ambientalmente relevantes. Tanto en el grupo de control (0 ngL⁻¹) como en el sistema de 0.05% de DMSO, no se observaron malformaciones, todos los embriones se desarrollaron normalmente al final de las 96 horas. La frecuencia y la gravedad de las malformaciones aumentaron con el incremento de la concentración de PHE en comparación con los embriones de los grupos de control (Fig. 6).

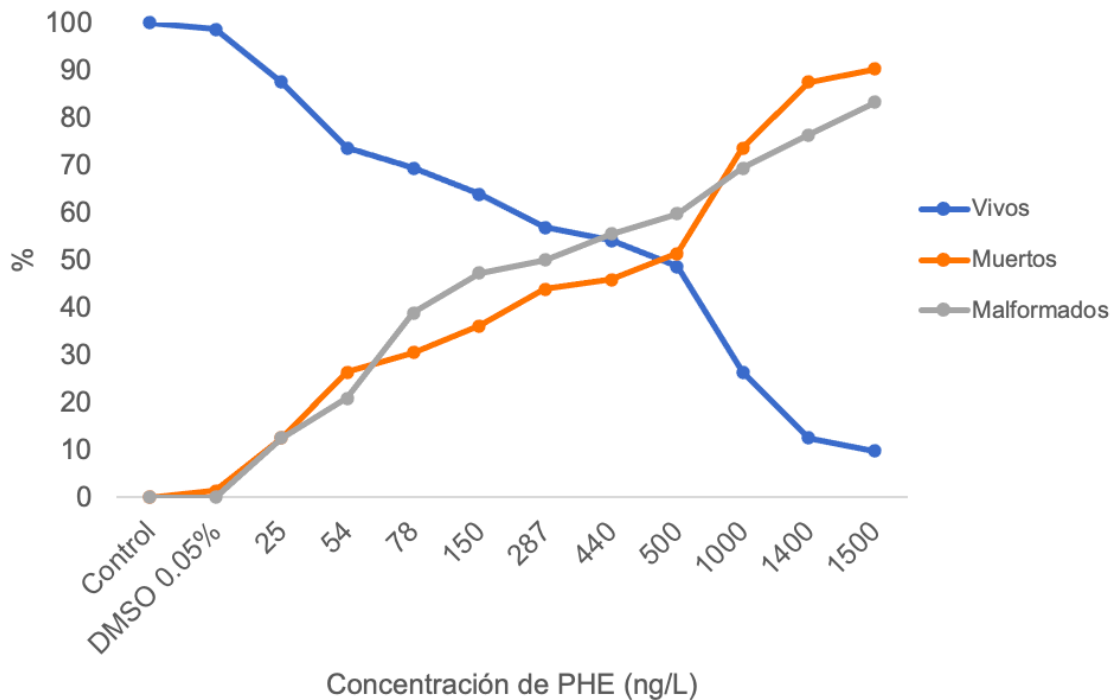


Figura 6. Tasas de supervivencia, mortalidad y malformaciones en embriones de pez cebra expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de PHE.

La tasa de eclosión de los embriones disminuyó significativamente en un patrón dependiente de la concentración en comparación con el grupo de control. La tasa de mortalidad de los embriones de *D. rerio* aumentó significativamente cuando se expusieron a 1400 y 1500 ngL⁻¹ de PHE hasta las 96 h (Fig. 7). Además, la PHE indujo anomalías morfológicas durante el desarrollo embrionario, incluyendo retraso en el

desarrollo (38%), deformación de los ojos (5.3%), hipopigmentación (27.3%), hemorragia en la cabeza (5.1%), hemorragia en el saco (16,4%), miscelánea (32.2%), modificación en la estructura de la corda (31.5%), malformación de la cabeza (18.5%), malformación de la cola (34%), edema pericárdico (18%), deformación del saco (22%) y edema en el saco (16%). Las tasas de malformación se observaron con un aumento dependiente de la concentración, teniendo la concentración más alta el valor máximo a las 96 h (Fig. 7 y 8).

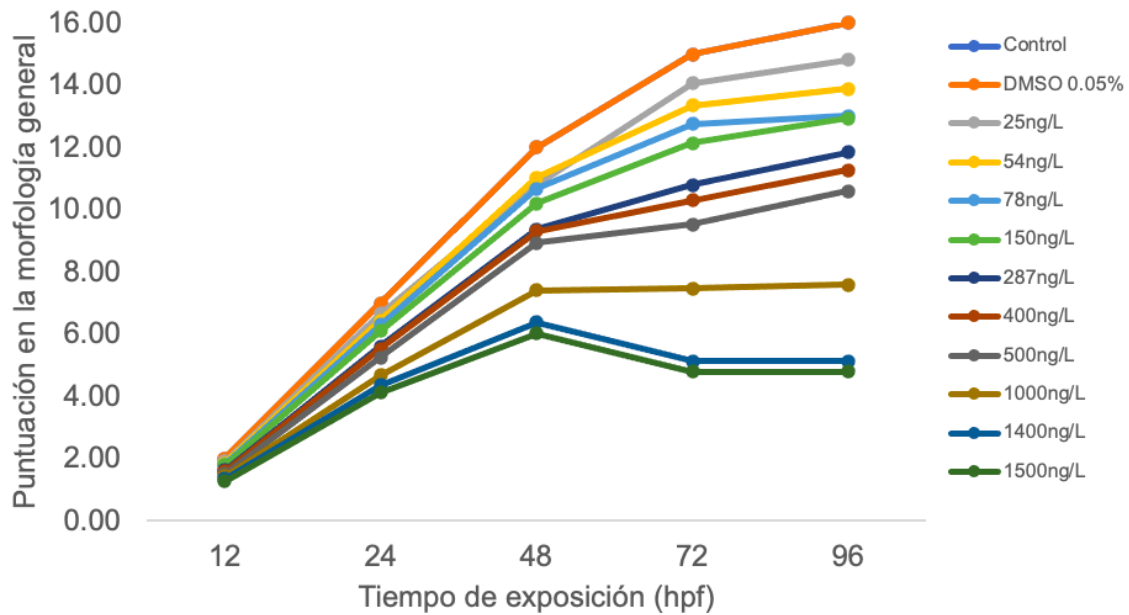


Figura 7. Curva tiempo-respuesta de la puntuación en la morfología general en embriones de *D. rerio* expuestos a PHE.

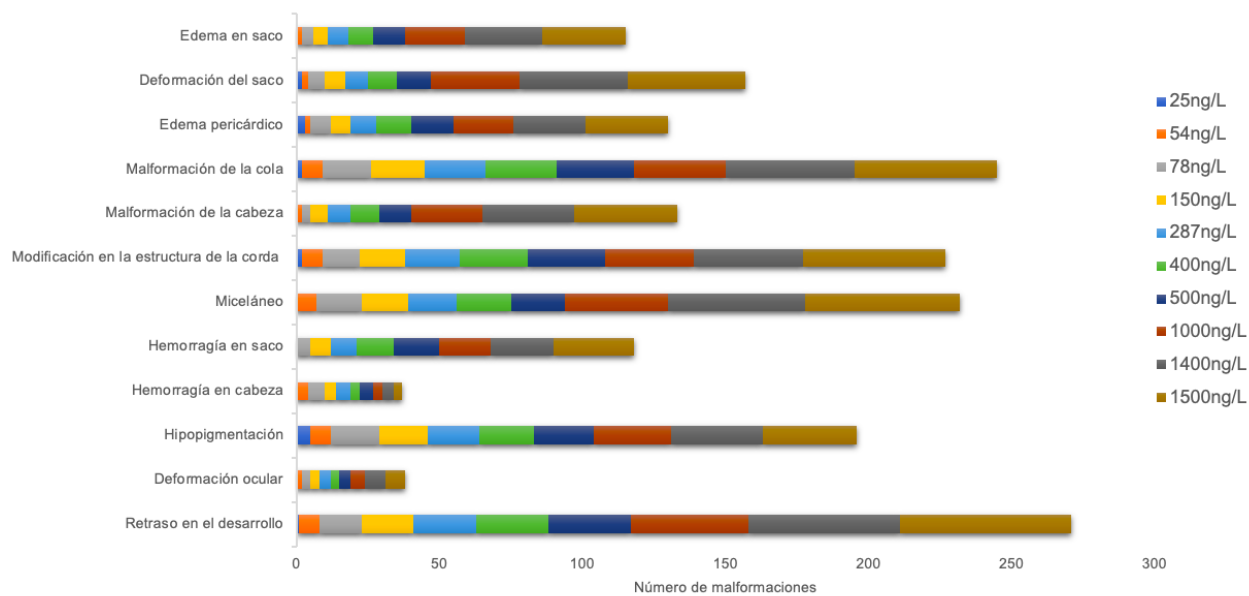
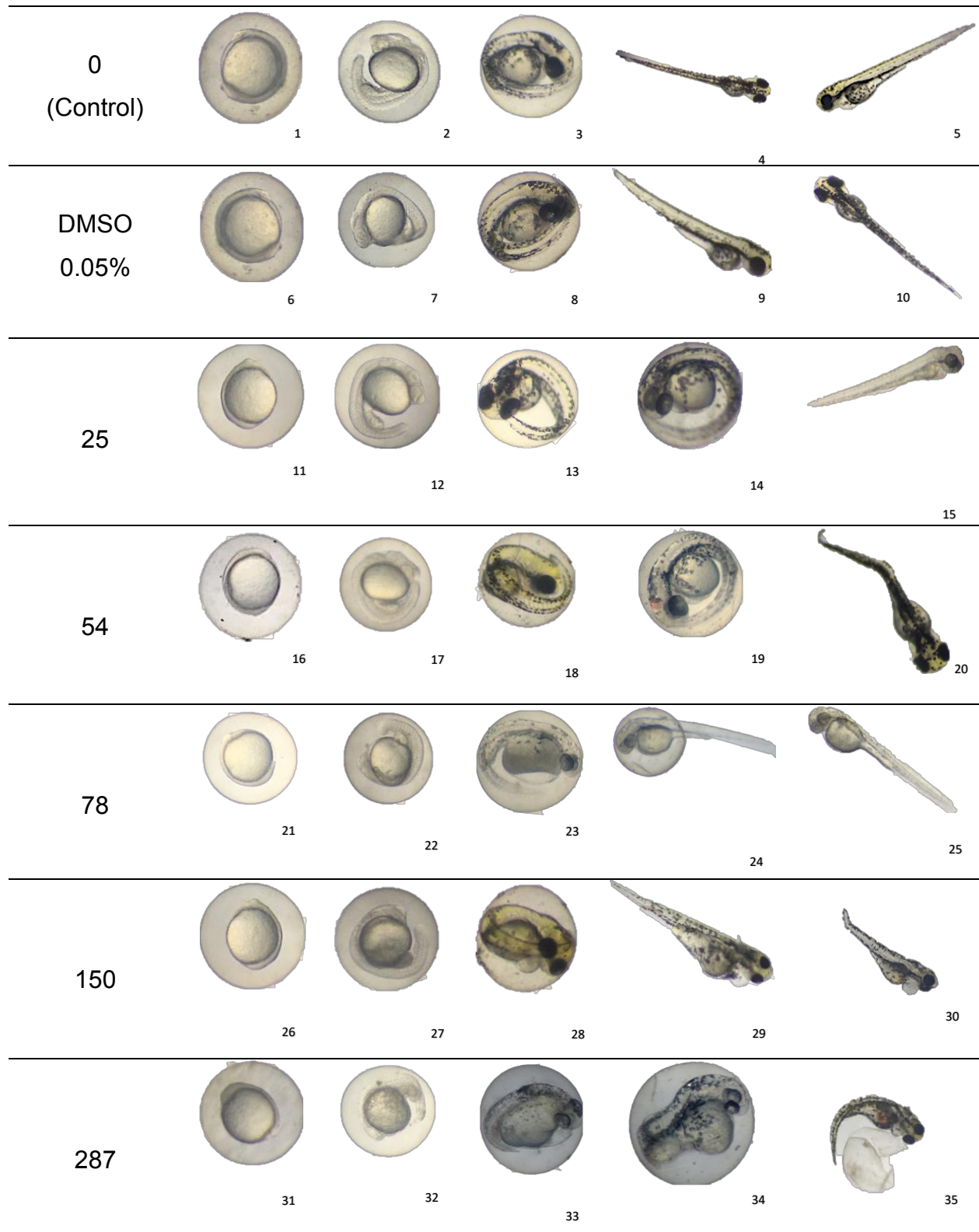


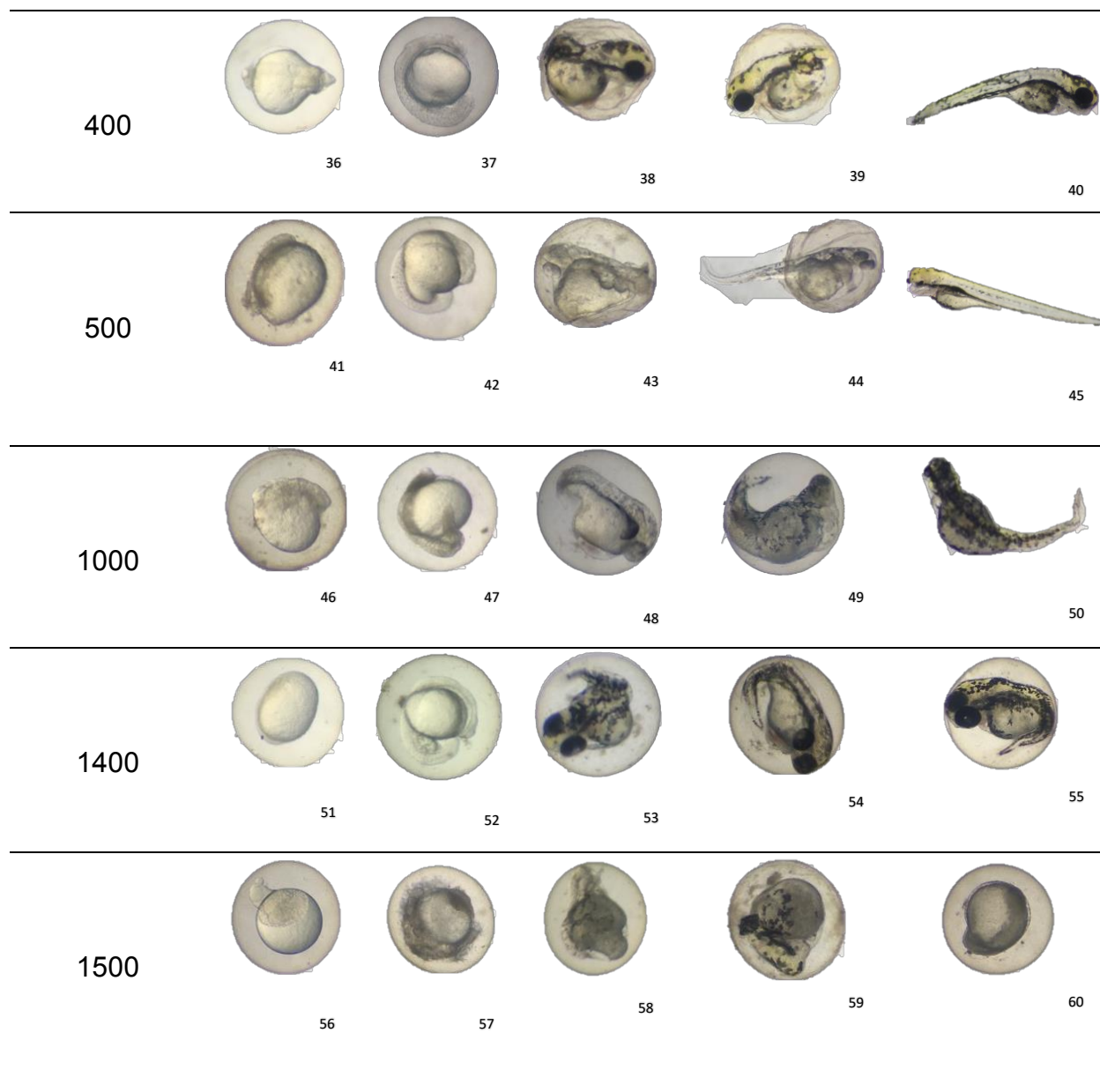
Figura 8. Frecuencia de las principales malformaciones inducidas por la exposición de embriones de *D. rerio* a diferentes concentraciones de PHE.

La tabla 7 representa imágenes de embriones de *D. rerio* de 12 a 96 hpf. El grupo de control (1-5) y el sistema del grupo de control con 0.05% DMSO (6-10) mostraron un desarrollo normal hasta las 96 hpf. Imágenes microscópicas de malformaciones representativas en embriones expuestos a 10 diferentes concentraciones ambientalmente relevantes de PHE, incluyendo retraso del desarrollo (24, 33, 34, 38, 39, 43, 51-60), deformación ocular (28, 44, 45), hipopigmentación (15, 23, 24, 25, 45), hemorragia en la cabeza (19), hemorragia en el saco (23, 34, 48, 54), misceláneo (34, 35, 48, 49, 50, 53, 59), modificación en la estructura de la corda (20, 34, 35, 40, 49, 50), malformación de la cabeza (43, 44, 45, 49, 50), malformación de la cola (20, 30, 44, 49, 50), edema pericárdico (28, 29, 30, 44, 49, 54), deformación del saco (23, 33, 42, 43, 48) y edema en el saco (23, 43, 48), en larvas de pez cebra tras la exposición embrionaria a PHE.

Tabla 7. Principales malformaciones presentes en embriones de *D. rerio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de PHE.

Concentración (ngL ⁻¹)	12hpf	24hpf	48hpf	72hpf	96hpf
---------------------------------------	-------	-------	-------	-------	-------





La tabla 8 resume la teratogenicidad debida a la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de PHE. La coagulación de los ovocitos fue mayor en el grupo expuesto a 1500 ngL⁻¹ (90.3%), seguido del grupo expuesto a 1400 ngL⁻¹ (87.5%). No hubo coagulación en los ovocitos de los grupos de DMSO al 0.05% ni en el grupo control. El retraso en el desarrollo, que se observó principalmente en la modificación de la estructura de la corda y cola corta, fue más frecuente en el grupo expuesto a 1500 ngL⁻¹ y en menor medida en el grupo expuesto a 25 ngL⁻¹ PHE (Fig. 8).

Tabla 8. Datos de supervivencia, mortalidad y malformaciones en embriones de *D. rerio* expuestos a PHE

Concentración PHE ngL ⁻¹	Número de embriones expuestos	Supervivencia (%)	Mortalidad (%)	Malformados (%)
0 (control)	72	100	0	0
DMSO 0.05%	72	98.61	1.38	0
25	72	87.5	12.5	12.5
54	72	73.61	26.38	20.83
78	72	69.44	30.55	38.88
150	72	63.88	36.11	47.22
287	72	56.94	43.05	50
400	72	54.16	45.83	55.55
500	72	48.61	51.38	59.72
1000	72	26.38	73.61	69.44
1400	72	12.5	87.5	76.38
1500	72	9.72	90.27	83.33
			CL ₅₀ =282.13	CE ₅₀ =252.60
			CI=[189.5-408.5]	CI=[200.9-315.6]
			IT=1.1	

IT = Índice teratogénico

Determinación del estrés oxidativo en embriones de *D. rerio*

La figura 9 muestra los resultados de los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo. En cuanto a los indicadores de estrés oxidativo, se midieron los niveles de lipoperoxidación (contenido de malondialdehído), carbonilo proteico y contenido de hidroperóxidos, y las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en las larvas de *D. rerio* expuestas a PHE.

Evaluación del daño oxidativo en embriones de *D. rerio*

Los resultados de los biomarcadores de oxidación celular se muestran en la Fig. 9A. La PHE produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) respecto al grupo control en el biomarcador de peroxidación lipídica (MDA) de manera dependiente de la concentración, con aumentos a las 72 h de 152 a 320% y a las 96 h de 165 a 367%. Se observó que no había diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los niveles de PCC en la exposición a 25, 54 y 78ngL⁻¹ de PHE), mientras que en las concentraciones de exposición de 150, 287, 400, 500, 1000, 1400 y 1500ngL⁻¹ hubo un aumento significativo

($p < 0.05$) de forma dependiente de la concentración a las 72 h de 196%, 328%, 437%, 534%, 712%, 838% y 886% y a las 96 h de exposición de 198%, 253%, 446%, 573%, 747%, 894% y 956% respectivamente. Para los resultados del contenido de hidroperóxido, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo control sólo a partir de la concentración de 150ngL^{-1} (170%), 287ngL^{-1} (211%), 400ngL^{-1} (291%), 500ngL^{-1} (362%), 1000ngL^{-1} (512%), 1400ngL^{-1} (592%) y 1500ngL^{-1} (738%) para las 72 h de exposición; y para las 96 h de exposición de 78ngL^{-1} (214%), 150ngL^{-1} (250%), 287ngL^{-1} (306%), 400ngL^{-1} (389%), 500ngL^{-1} (479%), 1000ngL^{-1} (535%), 1400ngL^{-1} (615%) y 1500ngL^{-1} (790%), el aumento del HPC se observó de manera dependiente de la concentración.

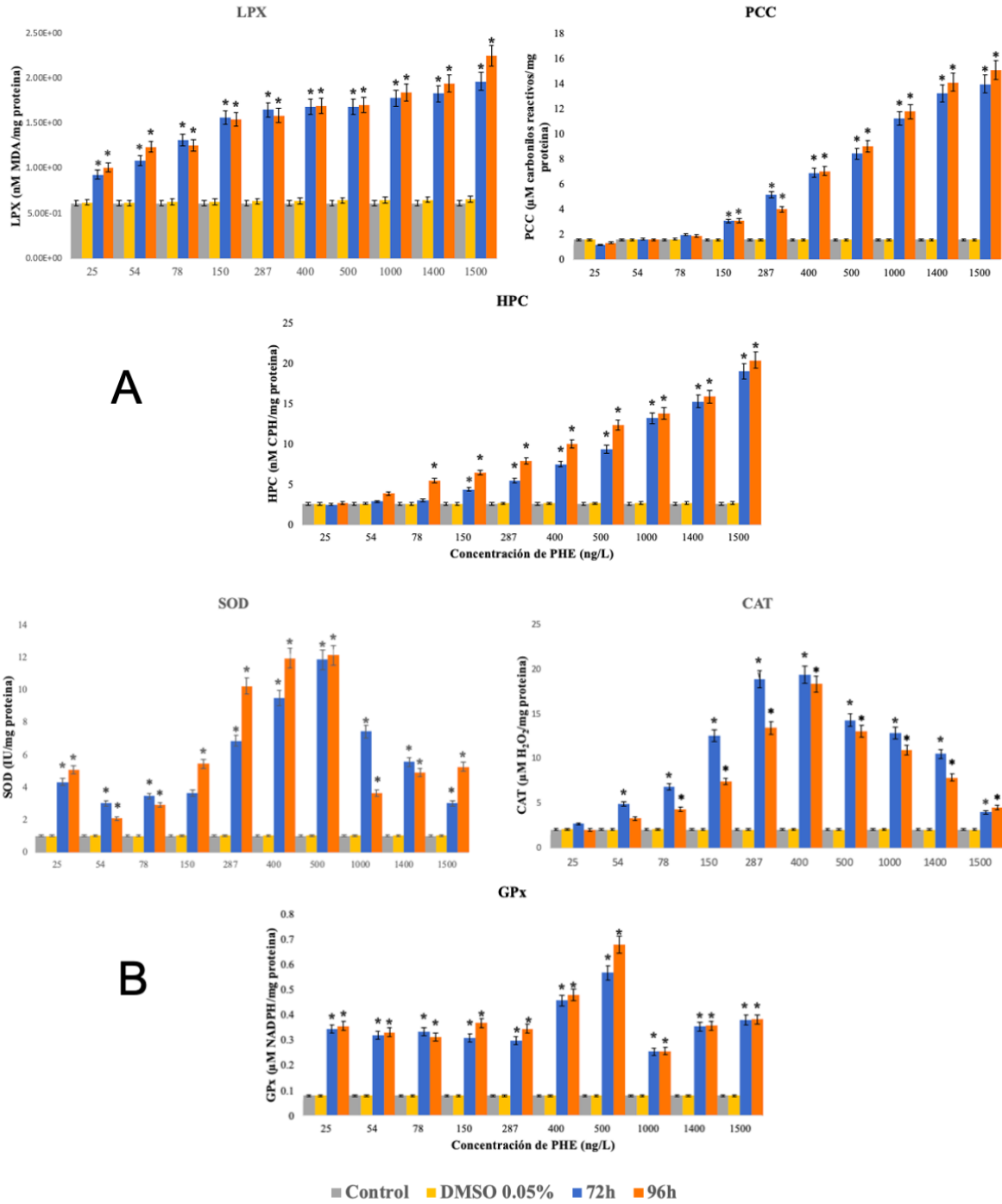


Figura 9. Efectos de la exposición a PHE sobre los biomarcadores de oxidación celular (A) y las actividades antioxidantes de SOD, CAT y GPx (B) en larvas de pez cebra después de 72 y 96 hpf. Los valores son la media \pm SEM de tres réplicas. * Diferencia significativa respecto al grupo de control ($p < 0.05$).

Actividad de enzimas antioxidantes en embriones de *D. rerio*

Los resultados de la actividad SOD se muestran en la figura 9B. La actividad enzimática fue significativamente ($p < 0.05$) mayor en todas las concentraciones probadas en comparación con el grupo control. Mostrando un aumento para 25ngL⁻¹, 54ngL⁻¹, 78ngL⁻¹, 150ngL⁻¹, 287ngL⁻¹, 400ngL⁻¹, 500ngL⁻¹, 1000ngL⁻¹, 1400ngL⁻¹ y 1500ngL⁻¹ a las 72 h de 425, 297, 340, 360, 676 936, 1165, 730, 547 y 297% y para 96 h de 500, 205, 287, 535, 1000, 1174, 1194, 360, 483 y 517 % con respecto a la actividad enzimática del grupo control. En lo que respecta a la actividad de la enzima CAT, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto a las larvas del grupo control a partir de la concentración de 54ngL⁻¹ a las 72 h de exposición (239%), 78ngL⁻¹ (329%), 150ngL⁻¹ (601%), 287ngL⁻¹ (902%), 400ngL⁻¹ (927%), 500ngL⁻¹ (684%), 1000ngL⁻¹ (523%), 1400ngL⁻¹ (376%) y 1500ngL⁻¹ (218%), para 96 h de exposición se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto al grupo control a partir de 78ngL⁻¹ y hasta 1500ngL⁻¹ de 208%, 357%; 642%; 876%, 624%, 523%, 376% y 218%, respectivamente. La PHE indujo un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto al grupo control en la actividad de la enzima GPx en todas las concentraciones de exposición (25 a 1500ngL⁻¹) a las 72 h 431, 401, 48, 387, 373, 571, 709, 318, 443 y 474 % y para las 96 h de 446, 415, 391, 460, 432, 598, 848, 322, 447 y 478 % respectivamente.

Determinación de la PHE

La tabla 9 muestra los valores de las concentraciones de PHE en el agua de los sistemas de exposición, observándose una tendencia decreciente de la concentración de PHE respecto al tiempo de exposición. Sin embargo, la concentración en todos los sistemas se mantuvo por encima del 80% de la concentración inicial.

Tabla 9. Determinación de la concentración de PHE en el agua del sistema de exposición.

Concentración de PHE (ngL ⁻¹)	Concentraciones de PHE medidas a diferentes tiempos de exposición (ngL ⁻¹)					
	0 hpf	12 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
Control	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ
0.05% DMSO	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ
25	24.98±0.03	24.89±0.03	24.76±0.02	24.66±0.02	22.32±0.01	20.97±0.03

54	53.84±0.06	53.09±0.06	53.07±0.06	52.75±0.05	49.08±0.05	43.92±0.05
78	77.90±0.08	77.56±0.08	77.01±0.09	76.87±0.1	70.80±0.1	63.56±0.1
150	148.9±0.11	148.54±0.11	147.96±0.13	147.77±0.13	136.88±0.13	124.59±0.13
287	286.94±0.18	286.78±0.18	286.03±0.19	285.01±0.19	265.95±0.19	230.32±0.19
400	398.01±0.21	396.17±0.21	390.32±0.21	387.65±0.25	352.12±0.25	327.32±0.25
500	496.12±0.27	490.34±0.27	487.45±0.27	483.76±0.31	445.85±0.31	412.46±0.31
1000	995.03±0.30	974.12±0.30	961.56±0.30	937.43±0.42	912.23±0.42	879.34±0.42
1400	1396.34±0.45	1367.23±0.45	1311.65±0.45	1294.67±0.56	1278.34±0.56	1243.89±0.56
1500	1496.32±0.93	1456.43±0.93	1425.12±0.93	1402.56±1.1	1398.34±1.1	1357.74±1.1

Los valores representan la media ± desviación estándar de cada concentración. LoQ: límite de cuantificación (5 ngL⁻¹).

Respuesta integrada de biomarcadores (IBR)

En el presente estudio, se eligió una batería de biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo para evaluar si éste se produce en las larvas de pez cebra expuestas a PHE. Por lo tanto, para facilitar la interpretación, las respuestas se integraron calculando el índice IBR para cada biomarcador evaluado (figura 10). En orden ascendente, los valores de IBR observados para 72 h fueron 54<278<25<400<78<150<1000<500<1400<1500ngL⁻¹ y para las 96 h de exposición 278<1400<54<1500<150<25<25<1000<78<400<500ngL⁻¹. Los valores de IBR mostraron que el estrés causado por la concentración de 500ngL⁻¹ a las 96 h de exposición fue el más alto, con un valor de 18.1. El IBR para la concentración probada a las 72 h fue de 1.6, 0.9, 2.17, 2.2, 1.5, 1.9, 4.1, 3.2, 4.5, 4.9 y para las 96 h de 4.1, 3.3, 7.6, 3.8, 1.3, 10.9, 18.1, 6.3, 2.7 y 3.7 respectivamente.

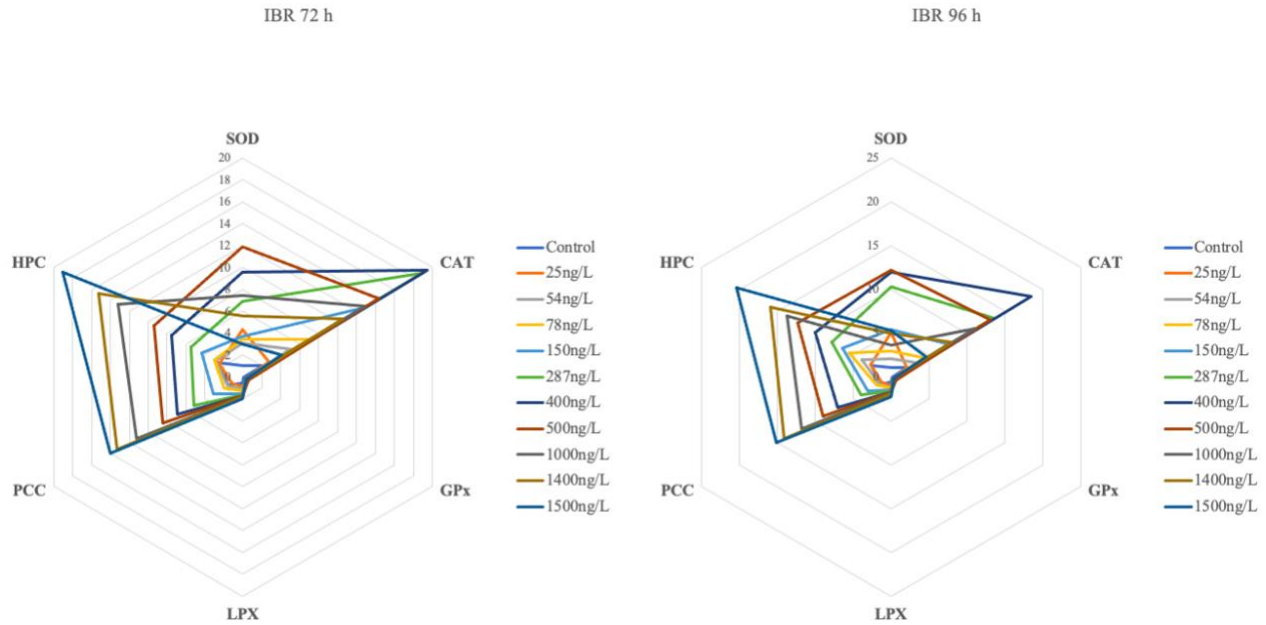


Figura 10. Índice integrado de respuestas de biomarcadores para larvas de *Danio rerio* expuestas a concentraciones ambientalmente relevantes de PHE. La comparación gráfica se basó en seis biomarcadores de estrés oxidativo a las 72 y 96 hpf.

Efectos de la exposición a PHE en los parámetros de comportamiento

No se observaron signos de toxicidad sistémica (morfología macroscópica o letalidad) en las tres concentraciones de PHE probadas. A la concentración de 25 ngL⁻¹, no se observaron diferencias significativas en la distancia total recorrida, en la distancia recorrida en la parte superior e inferior, en el tiempo de permanencia en la parte superior e inferior y en la frecuencia de las transiciones en comparación con el grupo control (figura 11). Sin embargo, en las concentraciones de 282 ngL⁻¹ y 1500 ngL⁻¹, observamos cambios significativos respecto al grupo control. Por ejemplo, los peces expuestos a 282 ngL⁻¹ de PHE mostraron un aumento significativo en la distancia total recorrida ($F(3,20) = 47.896$; $p < 0.001$), la distancia recorrida en la parte superior e inferior ($F(3,20) = 34.800$; $p < 0.001$), el tiempo de permanencia en la parte superior ($F(3,20) = 1203.071$; $p < 0.001$), la latencia para entrar en la parte superior ($F(3,20) = 19.620$; $p < 0.001$), el número de transiciones a la parte inferior ($F(3,20) = 46.722$; $p < 0.001$) y la duración del congelamiento en la parte superior ($F(3,20) = 1245.709$; $p < 0.001$) en comparación con el grupo control. A diferencia de la concentración de 282 ngL⁻¹, los peces expuestos a la mayor concentración de PHE mostraron una disminución significativa en la distancia total recorrida ($F(3,20) = 34.678$; $p < 0.001$), la latencia para entrar en la parte superior

($F(3,20)= 14.356$; $p < 0.001$), el número de transiciones a la parte superior y a la inferior ($F(3,20)= 18.487$; $p < 0.001$), el tiempo de permanencia en la parte inferior ($F(3,20)= 27,371$; $p < 0,001$) y la distancia recorrida en la parte inferior ($F(3.20)= 28.089$; $p < 0.001$) en comparación con el grupo control.

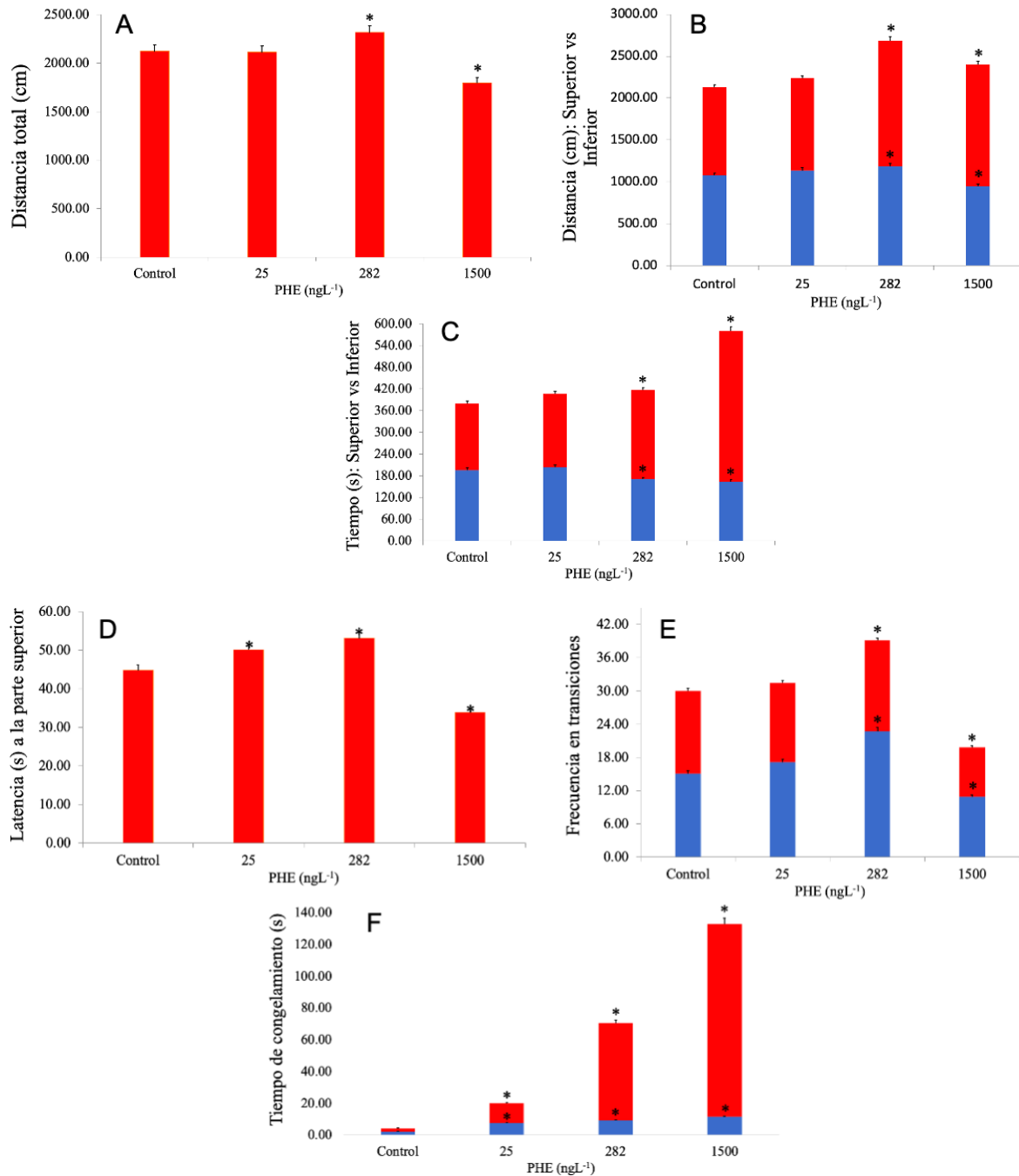


Figura 11. Efectos de la PHE en los parámetros de comportamiento evaluados en el pez cebra. A- distancia total recorrida, B- distancia recorrida en la zona superior (rojo) e inferior (azul), C- número de

transiciones (superior > inferior e inferior > superior), D- tiempo de permanencia en la zona superior e inferior, E- latencia a la entrada en la zona superior, y F- tiempo de congelamiento. Los valores se expresan como media \pm SEM. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas con el grupo de control ($p < 0.05$).

Biomarcadores de estrés oxidativo en el cerebro del pez cebra

La lipoperoxidación (LPX) aumentó significativamente ($F(3,8)=168.215$; $p < 0.001$) en todos los grupos de tratamiento en comparación con el grupo control (figura 12A). Como el aumento de LPX en el cerebro de los peces fue de una manera dependiente de la concentración, el pico más alto se observó en la concentración de 1500 ng^{-1} (3.3 veces mayor que en el grupo de control). Al igual que la LPX, el daño oxidativo de las proteínas (PCC) en el cerebro mostró un aumento significativo ($F(3,8) = 56.883$; $p < 0.001$) de forma dependiente de la concentración en comparación con el grupo control. Así, los niveles de carbonilación de proteínas en los grupos expuestos a 25, 282 y 1500 ngL^{-1} aumentaron significativamente 1.4, 1.8 y 4 veces, respectivamente, en comparación con el grupo de control. En cuanto al contenido de hidropéroxido (HPC) en los cerebros de los peces expuestos a PHE, hubo un aumento significativo de 1.6, 2.2 y 2.8 veces ($F(3,8) = 63.009$; $p < 0.001$) en las concentraciones de 25, 282 y 1500 ngL^{-1} , respectivamente.

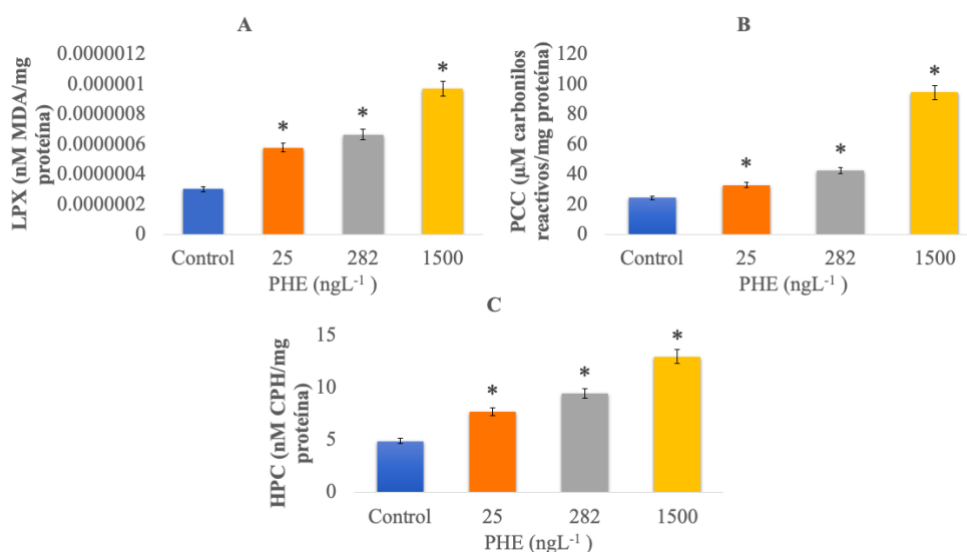


Figura 12. Biomarcadores de daño oxidativo en cerebro de pez cebra. Los gráficos representan los cambios en nM de MDA/mg de proteína como medida de la peroxidación lipídica (A), μM de carbonilos reactivos/mg de proteína como medida de la carbonilación proteica (B), y nM de CPH/mg de proteína como medida del contenido de hidropéroxido (C) en el cerebro del pez cebra tras la exposición a PHE.

Los valores se expresan como media \pm SEM. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas con el grupo de control.

Los efectos de la exposición a PHE durante 96 h sobre las actividades de las enzimas antioxidantes mostraron una tendencia similar, observándose un aumento significativo de su actividad de forma dependiente de la concentración en los peces expuestos en comparación con los controles (Fig. 13A-C). La actividad de la SOD ($F(3,8) = 65.335$; $p < 0.001$) en los tratamientos de 25, 282 y 1500 ngL^{-1} aumentó 1.7, 2 y 2.6 veces, respectivamente, después de 96 h de tratamiento que la actividad observada en el cerebro de los peces control. Del mismo modo, los niveles de CAT ($F(3,8) = 60.895$; $p < 0.001$) aumentaron 1.9, 2.5 y 3.1 veces después de 96 h de exposición en comparación con el grupo de control. En cambio, la actividad de la enzima GPx ($F(3,8) = 260.950$; $p < 0.001$) sólo mostró diferencias significativas en los tratamientos de 282 y 1500 ngL^{-1} tras 96 h de tratamiento, aumentando 2.2 y 4.1 veces, respectivamente.

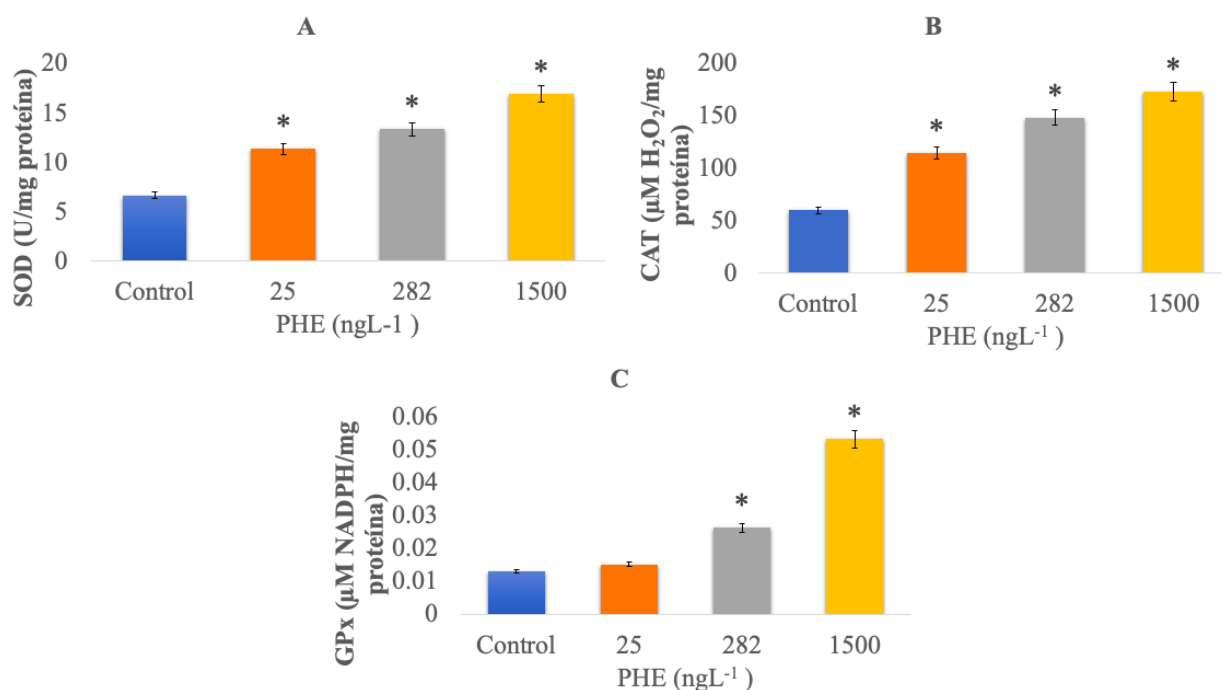


Figura 13. Actividad de las enzimas antioxidantes en cerebro de pez cebra. Gráficos que representan los cambios en la concentración de la actividad de SOD (U/mg de proteína, **A**), CAT ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ de proteína, **B**) y GPx ($\mu\text{M NADPH}/\text{mg}$ de proteína, **C**) en el cerebro del pez cebra tras la exposición a PHE. Los valores se expresan como media \pm SEM, N= 18 por grupo. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas con el grupo de control ($p < 0.05$).

Actividad de la AChE

La exposición a 25 ngL⁻¹ PHE no cambió significativamente la actividad AChE en el cerebro del pez cebra en comparación con el grupo de control (figura 14). Sin embargo, la actividad AChE ($F(3.8) = 30.407$; $p < 0.001$) aumentó significativamente en los grupos de exposición a 282 y 1500 ngL⁻¹ PHE en 1.5 y 2.6 veces, respectivamente, después de 96 horas de exposición.

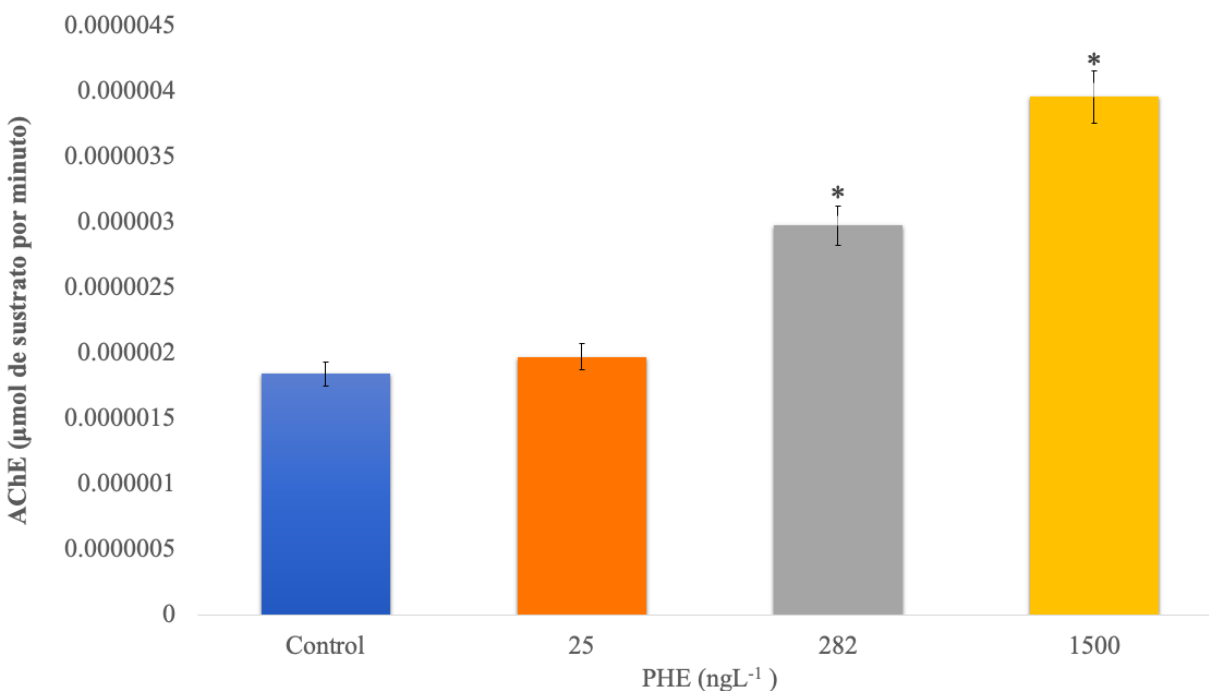


Figura 14. Actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en el cerebro de los peces cebra expuestos durante 96 h a PHE. Los valores se expresan como media \pm SEM. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas con el grupo de control.

Determinación de la PHE en el agua y en el cerebro del pez cebra

La determinación de la concentración de PHE en el homogeneizado de cerebro de pez cebra confirmó que el fármaco fue absorbido tras su administración y atravesó la barrera hematoencefálica (tabla 10). Siguiendo lo mencionado anteriormente, las concentraciones de PHE en las muestras de agua disminuyeron a las 96 hpf en comparación con las concentraciones nominales. Así, la PHE se bioconcentró en el cerebro. El FBC para cada una de las concentraciones fue de 2.1, 3.4 y 4.6, respectivamente.

Tabla 10. Concentraciones de PHE en el agua al inicio de la exposición y después de 96 h de exposición, y concentraciones de PHE y factor de bioconcentración (FBC) en cerebros de pez cebra expuestos durante 96 h.

Concentraciones nominales PHE (ngL ⁻¹)	Concentración en muestras de agua (ngL ⁻¹)		Concentración en cerebro de pez cebra (ngg ⁻¹)	FBC
	0 h	96 h	96 h	
Control	ND	ND	ND	-
25	25.3 ± 0.122	21.5 ± 0.118	45.6 ± 0.301	2.1
282	280.3 ± 2.05	245.3 ± 2.34	834.1 ± 5.56	3.4
1500	1498 ± 95	1380 ± 90	6348.1 ± 321	4.6

ND no detectado. "-" sin datos. LoQ: Límite de cuantificación (1ngL⁻¹). Los datos se expresan como media ± SEM.

Correlación de Pearson entre los biomarcadores de estrés oxidativo y los niveles de AChE con los cambios de comportamiento.

La correlación entre los biomarcadores de estrés oxidativo, los niveles de AChE y el FBC con respecto a los cambios de comportamiento en el pez cebra expuesto a PHE durante 96 horas se representa en la figura 15. Los colores muestran la fuerza de la correlación que las variables tienen entre sí; a medida que la intensidad del color aumenta, la correlación entre las variables se hace más fuerte. El azul indica una correlación positiva entre las variables, mientras que el rojo indica una correlación negativa. Se puede observar una correlación positiva entre todos los biomarcadores de estrés oxidativo y nuestros resultados de la actividad de AChE. Además, la actividad de AChE y los biomarcadores de estrés oxidativo mostraron una fuerte correlación positiva con la distancia que los peces recorrieron en la parte superior, el tiempo que pasaron en la parte superior, el tiempo que permanecieron congelados y la cantidad de PHE que su cerebro bioconcentró. Sin embargo, cabe señalar que la correlación entre los biomarcadores de estrés oxidativo y la AChE con todos los demás puntos finales de comportamiento fue negativa.

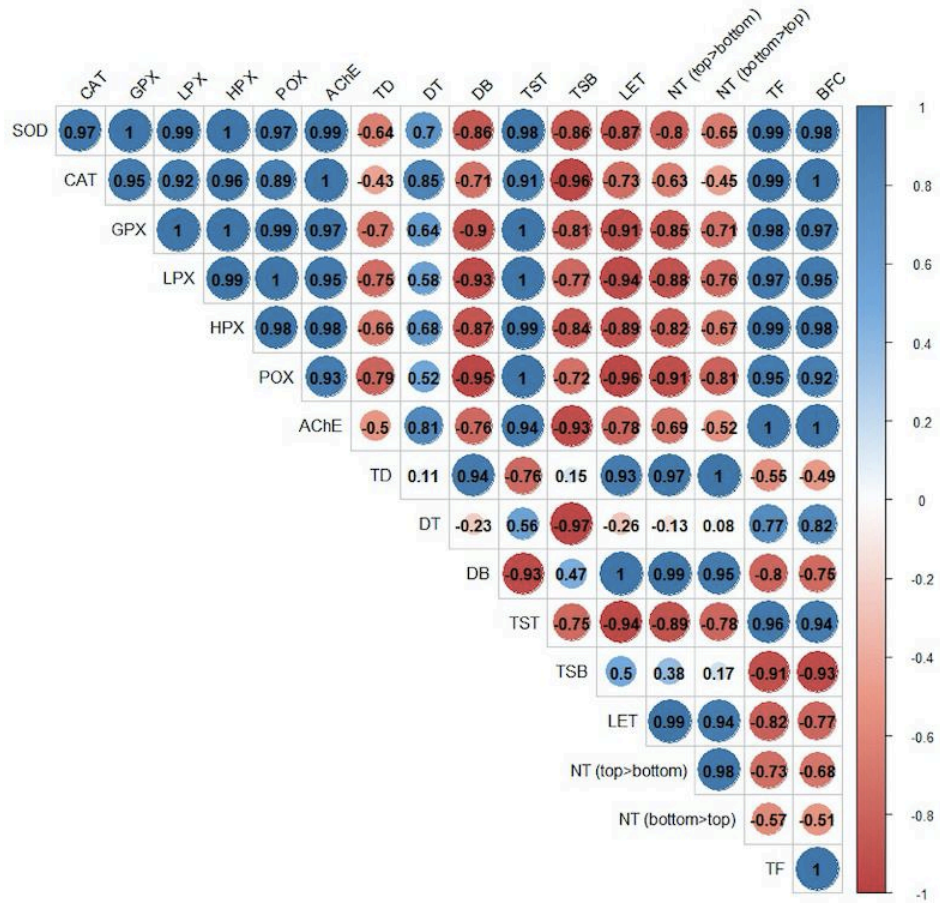


Figura 15. Correlación entre los biomarcadores de estrés oxidativo, los niveles de AChE y FBC con los cambios de comportamiento. TD (distancia total), DT (distancia en la parte superior), DB (distancia en la parte inferior), TST (tiempo empleado en la parte superior), TSB (tiempo empleado en la parte inferior), LET (latencia para entrar en la parte superior), NT (número de transiciones) Y TF (tiempo congelado).

Discusión

Varios estudios han utilizado concentraciones altas de xenobióticos, que no reflejan el escenario del entorno natural, por lo que decidimos trabajar con concentraciones ambientalmente relevantes de PHE, que reflejan el uso y la presencia de este fármaco en el entorno. Se ha demostrado que los cambios en la eclosión, las malformaciones y la mortalidad durante el desarrollo embrionario pueden utilizarse como buenos indicadores de toxicidad para evaluar el estrés causado por los tóxicos ambientales durante el desarrollo (Pohl, 2019; Qiang et al., 2016; L. Xia, Zheng, & Zhou, 2017; Zhou et al., 2019). Por ejemplo, (Martinez et al., 2018) observaron que la exposición a PHE (6.25-100 μ M) podía inhibir significativamente la tasa de eclosión, al tiempo que aumentaba las tasas de mortalidad y malformación durante el desarrollo embrionario en embriones de pez cebra. En el presente estudio, se observó que la PHE disminuía la tasa de eclosión y aumentaba las tasas de mortalidad y malformaciones con una respuesta aparentemente dependiente de la concentración y el tiempo. Las mortalidades previas a la eclosión mostraron edema pericárdico y del saco vitelino, así como retraso en el desarrollo. Esto indica que la PHE causaría toxicidad en el desarrollo de los peces, lo que supone un riesgo ecotoxicológico potencial para los ecosistemas acuáticos.

Los resultados obtenidos muestran que la CL_{50} y la CE_{50} de malformaciones a las 96 h de exposición se obtuvieron en 282.13 y 252.60 ngL^{-1} , respectivamente (tabla 7). Las concentraciones evaluadas en otros estudios dieron una CL_{50} de >250 μ M y una CE_{50} de 386 μ M dando un IT >1 (Weigt et al., 2011). El cálculo del índice teratogénico (TI=1.1) muestra que la PHE es teratogénica para los embriones de *D. rerio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes. Además, esto fue confirmado por la identificación de las diferentes malformaciones (retraso en el desarrollo, hipopigmentación, miscelánea, modificación en la estructura de la corda, malformación de la cola, deformación del saco, entre otras) observadas durante las 96 h de exposición. La toxicidad de la PHE durante el desarrollo embrionario de *D. rerio* ha sido investigada en estudios anteriores. Martínez et al., 2018 informan de un retraso en el desarrollo, reflejado en la reducción de la eclosión de manera dependiente de la dosis en los embriones expuestos a PHE en comparación con el grupo control, alcanzando un 35-40% de embriones eclosionados a las 48 h de exposición. Sin embargo, ninguna de las

concentraciones estudiadas afectó a la morfología general de las larvas. Weigt et al. (2011) informaron por primera vez de la capacidad de los embriones de *Danio rerio* para activar sustancias proteratogénicas (como la PHE) sin necesidad de añadir un sistema de activación metabólica exógena. Los embriones de pez cebra mostraron actividad enzimática de fase I en etapas muy tempranas del desarrollo. Hubo un aumento en el porcentaje de embriones con efectos teratogénicos expuestos a PHE, con un 43.3% reportado como el nivel máximo de efectos teratogénicos. En los grupos de tratamiento con PHE se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en todas las concentraciones probadas. Con un 51.4%, la malformación de la cola fue la más frecuente, concluyendo que la alteración de la eclosión fue el resultado de esta malformación y no la causa.

Para que se produzca el desarrollo normal se requiere un proceso complejo y altamente regulado que, cuando se interrumpe, puede provocar toxicidad en el desarrollo, causando malformaciones o mortalidad. En los últimos años, la investigación se ha centrado en el papel del estrés oxidativo en la toxicidad del desarrollo. La PHE ha sido bien estudiado en humanos, causando anomalías faciales y trastornos neurológicos en bebés expuestos durante el embarazo (Kupsco & Schlenk, 2015). Se ha propuesto que la toxicidad se debe a un radical libre intermedio, que se genera durante la bioactivación por la prostaglandina H sintasa (Parman, Chen, & Wells, 1998), y también puede formar aductos proteicos por el CYP450 (Munns, De Voss, Hooper, Dickinson, & Gillam, 1997). Además, la fenitoína puede aumentar la recombinación genética (Winn, Kim, & Nickoloff, 2003), ya que oxida el ADN y forma 8-hidroxiguanina (L. Liu & Wells, 1995). Liu and Wells, 1994, demostraron que la PHE podría conducir a la peroxidación de lípidos y a la oxidación de proteínas en las células embrionarias. Por lo tanto, se cree que el daño a los lípidos, a las proteínas y al ADN es la causa de la toxicidad en el desarrollo causada por la PHE.

Se ha informado de que el estrés oxidativo es la principal respuesta de los organismos acuáticos a la exposición a los contaminantes ambientales. El estrés oxidativo se produce cuando la producción de ERO supera a las enzimas antioxidantes. La producción excesiva de ROS puede alterar la integridad de la membrana celular (Muthulakshmi et al., 2018). La inducción del estrés oxidativo en nuestro estudio debido

a la exposición a PHE se evidencia por la oxidación celular y los biomarcadores de actividad de las enzimas antioxidantes.

La LPX es el resultado de una reacción en cadena de radicales libres, generando la degradación oxidativa de los lípidos. Los radicales libres abstraen átomos de hidrógeno de un grupo metilo (CH_2), dejando un electrón no apareado en el átomo de carbono ($\cdot\text{CH}$) de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular. En consecuencia, el carbono radical forma un dieno conjugado y puede reaccionar con una molécula de oxígeno para formar un radical peroxilo lipídico ($\text{LOO}\cdot$). Estos radicales pueden abstraer más átomos de hidrógeno, propagando el LPX y causando daños a las células (Taziki, Sattari, & Eghbal, 2013). Cuando se produce la degradación de los lípidos, se forman sustancias como el malondialdehído (MDA). La acumulación de MDA (LPX) se considera un biomarcador tardío de estrés oxidativo y daño celular (Dogan et al., 2011). En nuestro estudio, el contenido de MDA aumentó significativamente ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control en todas las concentraciones de PHE de una manera dependiente de la concentración. Otros estudios han demostrado que la PHE aumenta los niveles de LPX. Lui & Wells (1994) evaluaron el daño oxidativo causado por PHE en el tejido embrionario y materno. Inyectaron ratones preñados en la etapa de organogénesis. La peroxidación lipídica se incrementó significativamente en los microsomas hepáticos maternos, el citosol, las mitocondrias, los núcleos y el plasma, en los microsomas embrionarios, el citosol y las mitocondrias tras el tratamiento con fenitoína.

Además, Eghbal et al., 2014 evaluaron el mecanismo citotóxico de la PHE en hepatocitos de rata. Los resultados mostraron un aumento en la formación de ERO, la peroxidación lipídica y el daño mitocondrial. Por lo tanto, el aumento de los niveles de peroxidación lipídica en nuestro estudio puede atribuirse a la inducción del estrés oxidativo.

La PHE, cuando es hidroxilada por las enzimas del citocromo P450 (CYP), forma su metabolito fenólico, la 5-(p-hidroxifenil), 5-fenilhidantoína (HPPH), que puede ser oxidada para formar el catecol-PHE (Munns et al., 1997). Varios estudios han demostrado que el catecol-PHE forma aductos proteicos. El presente estudio mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en el nivel de carbonilos proteicos en concentraciones de 150 a 1500ngL^{-1} de PHE (Winn & Wells, 1997), utilizaron un modelo de cultivo de embriones de ratón para determinar si el mecanismo molecular para generar teratogénesis por PHE

es a través de la bioactivación por la prostaglandina H sintasa (PHS) y el daño oxidativo resultante en las proteínas y el ADN. Mediante la reacción de los grupos carbonilos de las proteínas con la 2,4-dinitrofenilhidrazina, se detectó la oxidación de las proteínas. La PHE aumentó significativamente la oxidación de las proteínas. Este estudio concluyó que la bioactivación embrionaria (PHS) y la oxidación de las proteínas y el ADN por ERO constituye un mecanismo molecular por el que causa toxicidad la PHE.

Durante la biotransformación enzimática de la PHE, pueden formarse intermedios reactivos que pueden conducir a un aumento de la cantidad de ERO, que pueden causar la oxidación del ADN. Esta oxidación puede inducir roturas en la doble cadena del ADN; durante la reparación de estas roturas, se puede generar recombinación homóloga y se pueden inducir cambios genéticos deletéreos. (Winn et al., 2003) utilizaron una línea celular para determinar si la PHE aumenta la recombinación homóloga y comprobar si estos cambios están involucrados en la toxicidad en el desarrollo inducida por la PHE. Esto mostró que la PHE aumenta tanto la oxidación del ADN como la recombinación homóloga en una manera dependiente de la concentración y el tiempo. Sugirieron que el daño al ADN iniciado por la PHE puede ser un mecanismo que medie en la toxicidad del desarrollo inducida por la PHE.

Aunque la formación de radicales libres es continua durante los procesos fisiológicos y desempeña un papel importante en el desarrollo, un aumento excesivo de la formación de ERO puede provocar toxicidad. Sin embargo, un grupo de enzimas antioxidantes forma parte del sistema de defensa celular (D. Santos, Vieira, Luzio, & Félix, 2018). Las SOD, que requieren un cofactor metálico para su actividad, son metaloenzimas que catalizan la reacción que dismuta el radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La CAT es la enzima responsable de degradar o reducir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (utilizando hierro o manganeso como cofactor) y está presente en casi todos los tejidos vivos. La GPx, una enzima intracelular, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y los peróxidos lipídicos en sus correspondientes alcoholes. Su actividad depende del selenio como cofactor. Desempeña un papel crucial en la protección de la célula contra el estrés oxidativo al inhibir el proceso de peroxidación lipídica. Estas enzimas se han propuesto como

biomarcadores de toxicidad, ya que la interacción entre ellas es de suma importancia en el mecanismo de defensa contra las ERO (Ighodaro & Akinloye, 2018).

La actividad de SOD en *D. rerio* es constante a lo largo de la morfogénesis y hasta los 7 dpf (Gauron et al., 2016). En nuestro estudio, la actividad SOD aumentó significativamente ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control en todas las concentraciones probadas. Se observó un aumento a partir de la concentración de 25 a 50 ngL^{-1} ; de 1000 a 1500 ngL^{-1} se observó un agotamiento de la actividad SOD. Este efecto puede reflejar el estrés oxidativo experimentado por los grupos expuestos a mayores concentraciones de PHE. Esto es consistente con el estudio de (Mahle & Dasgupta, 1997), que reporta un estado antioxidante más bajo en sueros de pacientes tratados con PHE en comparación con sueros obtenidos de voluntarios sanos.

Se ha informado que la actividad de la enzima CAT aumenta después de 48 hpf cuando la morfogénesis está casi completa (Gauron et al., 2016). También se ha observado que la actividad de las enzimas antioxidantes tiene cambios dependientes de la etapa de desarrollo (Hu et al., 2016). Los resultados de nuestro estudio muestran que la PHE tuvo un efecto estimulante sobre la actividad de la CAT, de 54 a 400 ngL^{-1} . Además, de 500 a 1500 ngL^{-1} se observó que la actividad disminuyó gradualmente. Estudios anteriores han demostrado que altas concentraciones de anión superóxido pueden inhibir la actividad de CAT y SOD (Moreno et al., 2005).

La GPx es una enzima intracelular que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y los peróxidos lipídicos en sus correspondientes alcoholes. Desempeña un papel crucial en la protección de la célula contra el estrés oxidativo al inhibir el proceso de peroxidación lipídica. Los datos del presente estudio muestran una actividad constante de la GPx hasta una concentración de 287 ngL^{-1} , con un máximo en la actividad a 500 ngL^{-1} y una disminución de la actividad a concentraciones más altas. La GPx puede reducir los hidroperóxidos a compuestos hidroxilados utilizando GSH como sustrato, desintoxicando así el exceso de ERO mediante la oxidación de GSH a GSSG (Muthulakshmi et al., 2018). Por otro lado, durante la biotransformación de PHE, se forma un catecol-PHE; se ha informado de que los catecoles pueden sufrir más reacciones redox, lo que se ha demostrado que da lugar a la oxidación neta de GSH (Harris, Hiranruengchok, Lee,

Berberian, & Eurich, 1995). Esto puede explicar la disminución de la actividad de esta enzima a concentraciones más altas.

En el presente estudio, se eligió el índice IBR para determinar si la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de PHE conduce a un proceso de estrés oxidativo en los peces expuestos. El índice IBR se calculó utilizando los biomarcadores de estrés oxidativo para integrar la respuesta y facilitar su interpretación. Los valores de IBR se muestran en la figura 10. Se observó un aumento significativo de los valores de IBR en todas las concentraciones de PHE probadas; según estos resultados, los embriones de *D. rerio* expuestos a 1500ngL^{-1} sufrieron niveles de estrés más altos a las 96 h de exposición que los organismos de control. Además, los resultados demuestran la capacidad de los embriones de *D. rerio* para responder a concentraciones de PHE relevantes para el ambiente. Con la estandarización (S) de los valores, es posible definir qué biomarcador tuvo el mayor peso en el índice IBR (Iturburu, Bertrand, Mendieta, Amé, & Menone, 2018). De los biomarcadores seleccionados, la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx es más sensible a 400 y 500ngL^{-1} , mientras que los biomarcadores de oxidación celular fueron más sensibles a concentraciones de exposición más altas (1400 y 1500ngL^{-1}).

Con nuestros hallazgos y los identificados en otros trabajos en la figura 16 se muestra el posible mecanismo de acción por el cual la PHE puede generar estrés oxidativo y embriotoxicidad en embriones de pez cebra. Después de la absorción, la PHE puede ser bioactivada enzimáticamente por el CYP₄₅₀, la Prostaglandina H sintasa y la lipoxigenasa. Como se muestra en la figura 16, los principales metabolitos son derivados hidroxilados, 3,4 -dihidrodiol y el óxido de areno. El óxido de areno es un metabolito altamente reactivo y extremadamente inestable, al que se atribuyen efectos carcinógenos de la PHE (Patocka et al., 2020). Además, los metabolitos hidroxilados pueden ser biotransformados en un catecol que posteriormente puede ser oxidado para formar especies de quinonas y semiquinonas. Por otra parte, durante la síntesis de eicosanoides y prostaglandinas, la PHE puede ser oxidada por las hidroperoxidasas, dando lugar a radicales libres intermedios que al reaccionar con el oxígeno producen especies reactivas de oxígeno. Cuando no son desintoxicados por enzimas antioxidantes, los radicales libres pueden generar un estado de estrés oxidativo. Los resultados del

presente estudio apoyan la hipótesis de que durante la biotransformación enzimática de la PHE se generan radicales libres e intermedios reactivos capaces de generar especies reactivas de oxígeno, que pueden oxidar lípidos, proteínas y el ADN, provocando embriotoxicidad y teratogénesis (Cardoso-Vera et al., 2021; L. Liu & Wells, 1995; Patocka et al., 2020; Winn et al., 2003).

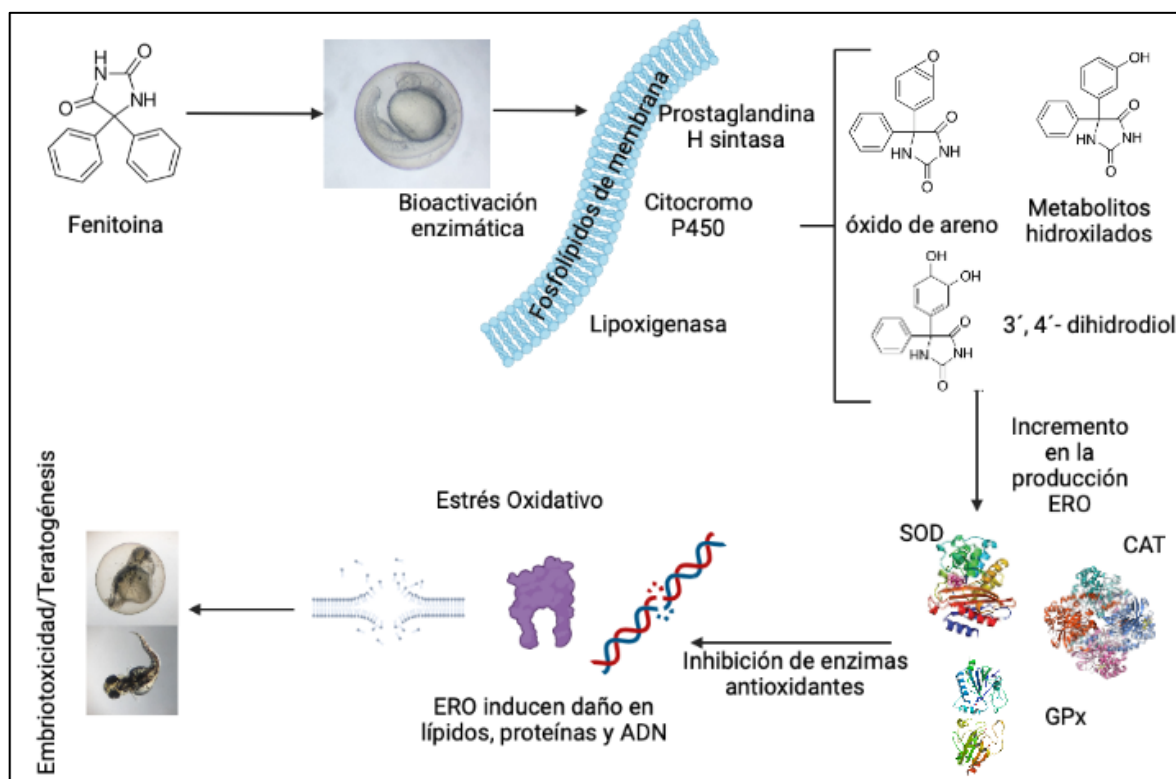


Figura 16. Potencial mecanismo implicado en la generación de estrés oxidativo y embriotoxicidad inducidos por la PHE en embriones de pez cebra.

El presente estudio también tuvo como objetivo evaluar los efectos de la exposición a PHE en especímenes adultos de pez cebra, utilizando un estudio multibiomarcador en el que se evaluaron los parámetros de comportamiento, la actividad de AChE y seis biomarcadores de estrés oxidativo en el cerebro del pez cebra adulto expuesto a PHE durante 96 h. El análisis de los parámetros de comportamiento se ha considerado una herramienta valiosa para evaluar los efectos de las sustancias químicas. La realización de análisis de comportamiento en el pez cebra no requiere equipos especializados costosos ni complejos conjuntos de herramientas o reactivos, y la inducción de respuestas de comportamiento en el pez cebra es más fácil que en los roedores (R. T.

Gerlai, 2020). Además, se eligió la evaluación del comportamiento del pez cebra porque la regulación del comportamiento del pez cebra está relacionada con la interacción entre los sistemas nerviosos central y periférico y el sistema neuroendocrino (Matsuda, Kang, Sakashita, Yahashi, & Vaudry, 2011; D. L. Zhang, Hu, Li, & Liu, 2013). Un método ampliamente utilizado para evaluar las condiciones de estrés en el pez cebra es la prueba del tanque nuevo (NTT) (Levin, Bencan, & Cerutti, 2007). Se informa que los peces cebra adultos pasan alrededor del 50% de una sesión de 5 minutos en el fondo del tanque, "habitando en el fondo", y se reportó que la nicotina disminuye esta preferencia. También se ha informado que los fármacos (ansiolíticos) como la buspirona, el diazepam y la fluoxetina disminuyen esta preferencia (Maximino et al., 2012). En este estudio, la actividad locomotora del pez cebra adulto no se vio afectada. Los estudios de Berghmans et al., 2007 y Martínez et al., 2018 en larvas de pez cebra expuestas a PHE también demostraron que este fármaco no afectaba a la actividad locomotora. Además, Tonelli et al., 2013 demostraron que la PHE en el rango de 1-50 mgKg⁻¹ no afecta a la actividad locomotora espontánea. Los peces cebra expuestos a 282 ngL⁻¹ mostraron un aumento en la distancia total recorrida. Por otro lado, los peces expuestos a 1500 ngL⁻¹ mostraron una disminución de la distancia total recorrida, de la latencia y de las transiciones hacia la parte superior, y un aumento del tiempo de permanencia en la parte superior. Estos resultados sugieren que la PHE tiene propiedades ansiolíticas sin producir alteraciones motoras en el pez cebra. Nuestros resultados coinciden con los de Pieróg et al., 2021, quienes realizaron una prueba de preferencia de colores, observando un efecto ansiolítico de la PHE en peces cebra adultos. Los autores observaron un aumento en el número de entradas del pez cebra en la zona aversiva amarilla frente a la zona de preferencia roja. Además, Dubey et al., 2015 demostraron un efecto ansiolítico similar en peces cebra expuestos a 450 µM de PHE.

Se ha evaluado el efecto de PHE en la respuesta conductual de las larvas de pez cebra a diferentes dosis y condiciones de iluminación (X. Liu et al., 2016). Los resultados muestran que bajo condiciones de luz u oscuridad, PHE ejerció un efecto estimulante a dosis bajas pero un efecto inhibitorio a dosis altas en las larvas de pez cebra. Se puede comparar con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Por ejemplo, a la concentración de 282 ngL⁻¹, se observó un efecto estimulante, mientras que los peces

cebra expuestos a 1500 ngL^{-1} mostraron una disminución de la actividad. Aunque el uso común de la PHE es como fármaco antiepiléptico, se ha reportado que tiene diversas neuroactividades y se ha probado como tratamiento en enfermedades como el trastorno bipolar (Patocka et al., 2020), el dolor neuropático (Hall et al., 2020), la neuritis óptica (Raftopoulos et al., 2016). Esto sugiere que los resultados encontrados en el presente trabajo pueden estar relacionados con diferentes vías a nivel molecular. Se ha informado de que las alteraciones en la relación entre el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el glutamato influyen en la excitabilidad neuronal (Guerrero, Giza, & Rotenberg, 2015). El principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro es el GABA, y parece estar implicado en la patogénesis de la ansiedad, ya que fármacos como las benzodiazepinas (estimulantes del receptor GABA) tienen efectos ansiolíticos y anticonvulsivos, mientras que el bloqueo del receptor GABA provoca episodios de ansiedad grave (X. Liu et al., 2016). Esto sugiere que la PHE puede estar alterando la relación entre el GABA y el glutamato en el pez cebra del presente estudio.

El cerebro es especialmente vulnerable a los daños causados por el estrés oxidativo, debido principalmente a tres factores: el alto consumo de oxígeno, la baja concentración de defensas antioxidantes y su alto contenido en grasas poliinsaturadas susceptibles de oxidación (Cobley, Fiorello, & Bailey, 2018). Las moléculas biológicas son propensas a la oxidación constante, lo que provoca un cambio estructural y, en consecuencia, una pérdida de función. Estas modificaciones relativamente estables se utilizan como marcadores de estrés oxidativo (Cenini, Lloret, & Cascella, 2019). La PHE es neurotóxica para los roedores, mostrando una reducción del peso del cerebro, un deterioro del sistema cerebeloso y del hipocampo, y déficits conductuales en tareas de aprendizaje e hiperactividad (Hatta et al., 1999; Inman, Morford, Moran, & Vorhees, 1999; Vorhees & Minck, 1989). Nuestros datos mostraron que la exposición a PHE durante 96 h tiene efectos en la peroxidación de lípidos (MDA), la carbonilación de proteínas y el contenido de hidróperóxido, ya que el contenido de estos biomarcadores aumentó de manera dependiente de la concentración en los tres grupos de exposición a PHE en relación con el grupo de control. Se ha reportado que las especies reactivas de oxígeno son producidas durante la biotransformación de PHE, resultando en niveles incrementados de lipoperoxidación de lípidos (C. S. Liu, Wu, Kao, & Wei, 1998), carbonilación de

proteínas, e incluso daño a los ácidos nucleicos (Kasapinovic, McCallum, Wiley, & Wells, 2004; Mahle & Dasgupta, 1997). Del mismo modo, la PHE actuó como inductor del estrés oxidativo en huevos de gallina, mostrando un aumento de la peroxidación lipídica en el hígado y el cerebro de los embriones expuestos a la droga (Hilscherova et al., 2003). Además, se observó un aumento en la formación de MDA, traducido en peroxidación lipídica, en roedores expuestos crónicamente a PHE (Reeta, Mehla, & Gupta, 2009). En contraste con nuestros hallazgos, Brandão et al., 2013 no observaron ningún daño oxidativo en el tejido hepático, digestivo y branquial de peces (*Lepomis gibbosus*) expuestos a PHE. Por el contrario, observaron una disminución significativa de los niveles de TBARS a una concentración de 25 μgL^{-1} en las branquias.

El estrés oxidativo se ha considerado la primera respuesta de los organismos acuáticos a la acción de los estresores ambientales (Livingstone, 2001). La activación paralela del sistema de defensa antioxidante de la célula reduce la generación de ERO. Además, se ha informado de que las células del cerebro del pez cebra pueden estimular las defensas antioxidantes para contrarrestar el ataque de los contaminantes ambientales (Richetti et al., 2011; Sarkar, Mukherjee, Chattopadhyay, & Bhattacharya, 2014). Las enzimas antioxidantes, como SOD, CAT y GPx, desempeñan un papel esencial en la protección celular contra el daño oxidativo. En el presente estudio, el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno, que se refleja en el daño a las biomoléculas, indujo un aumento significativo de la actividad de las enzimas SOD, CAT en las tres concentraciones probadas y un aumento significativo de la actividad GPx en las concentraciones de 282 y 1500 ngL^{-1} . Resultados similares han sido reportados por Brandão et al., 2013, quienes informaron que la exposición a PHE causó un aumento significativo en las actividades de CAT y glutatión S-transferasa (GST) en homogeneizados de hígado de pez luna (*Lepomis gibbosus*). Además, (Abramov & Wells, 2011) expusieron a PHE ratones transgénicos que expresan CAT humana. Los resultados mostraron elevaciones de 2 veces en las actividades de catalasa del cerebro embrionario y fetal, demostrando que la catalasa protege a los embriones tanto del estrés fisiológico como del generado por PHE. Estos datos y los obtenidos en el presente estudio son consistentes con la propuesta de que la neurotoxicidad inducida por la PHE puede deberse a la generación de intermediarios reactivos resultantes de la bioactivación

enzimática del fármaco. Nuestros resultados muestran que el nivel de inducción enzimática en los cerebros de los peces cebra expuestos a la PHE fue insuficiente para asegurar la desintoxicación de las especies reactivas de oxígeno y de los intermediarios reactivos generados, dando lugar a un estado de estrés oxidativo.

Varios estudios han demostrado que la acetilcolina está relacionada con los comportamientos de ansiedad y miedo, ya que las áreas cerebrales implicadas en los rasgos ansiosos presentan un alto impulso colinérgico (Ferlemi et al., 2014; A. Imam et al., 2018; Pidoplichko, Prager, Aroniadou-Anderjaska, & Braga, 2013; Vasilopoulou, Constantinou, Giannakopoulou, Giompres, & Margarity, 2016). En el presente estudio, observamos que las concentraciones de 282 y 1500 ngL⁻¹ de PHE provocaron una regulación al alza de la actividad de la AChE, que podemos relacionar con una condición de toxicidad inducida por la PHE. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Shahid et al., 2004, quienes observaron un aumento significativo de la actividad AChE en el cerebro de ratones tras la administración de 12 mgKg⁻¹ de PHE en comparación con el control. El aumento de la actividad de la AChE se asocia con una mayor degradación de la acetilcolina y una disminución de la estimulación de los receptores de neurotransmisores, causando efectos adversos en las funciones motoras y cognitivas (Aldenkamp & Vermeulen, 1995; Braakman et al., 2017; Gupta et al., 2013). Contrariamente a nuestros hallazgos, (Sudha, Lakshmana, & Pradhan, 1995) reportaron una reducción en la actividad de la AChE en el hipocampo y el estriado de ratas tratadas con dosis terapéuticas de PHE (75 mgKg⁻¹), atribuyendo el deterioro del aprendizaje, la memoria y las funciones cognitivas a los cambios neuroquímicos causados por la PHE. Además, (A. Mishra & Goe, 2015) observaron que el tratamiento con 30 mgKg⁻¹ de PHE perjudicó el rendimiento cognitivo en ratones, atribuyendo este efecto al aumento persistente de la actividad de la AChE, que conduce a una reducción de la acetilcolina y, por lo tanto, reduce la plasticidad sináptica y la memoria. Finalmente, en el presente estudio, podemos atribuir la inducción en la actividad AChE a los efectos conductuales y neurotóxicos inducidos por la PHE. Este aumento podría estar influenciado por la excesiva producción de radicales libres y el estado de estrés oxidativo (Mohan & Krishna, 2018; Pestana, Kinjo, Hernandez, & Britto, 2010), causando una rápida degradación del neurotransmisor acetilcolina y, en consecuencia, una disminución de la estimulación del

receptor. Además, estudios anteriores han demostrado que las modificaciones de las membranas lipídicas, evidenciadas en nuestro estudio por el aumento de la lipoperoxidación en los cerebros de pez cebra expuestos a PHE, pueden ser responsables de inducir la actividad de la AChE (Senger et al., 2011). En la figura 17 se muestra el posible mecanismo por el cual la PHE induce neurotoxicidad en el pez cebra.

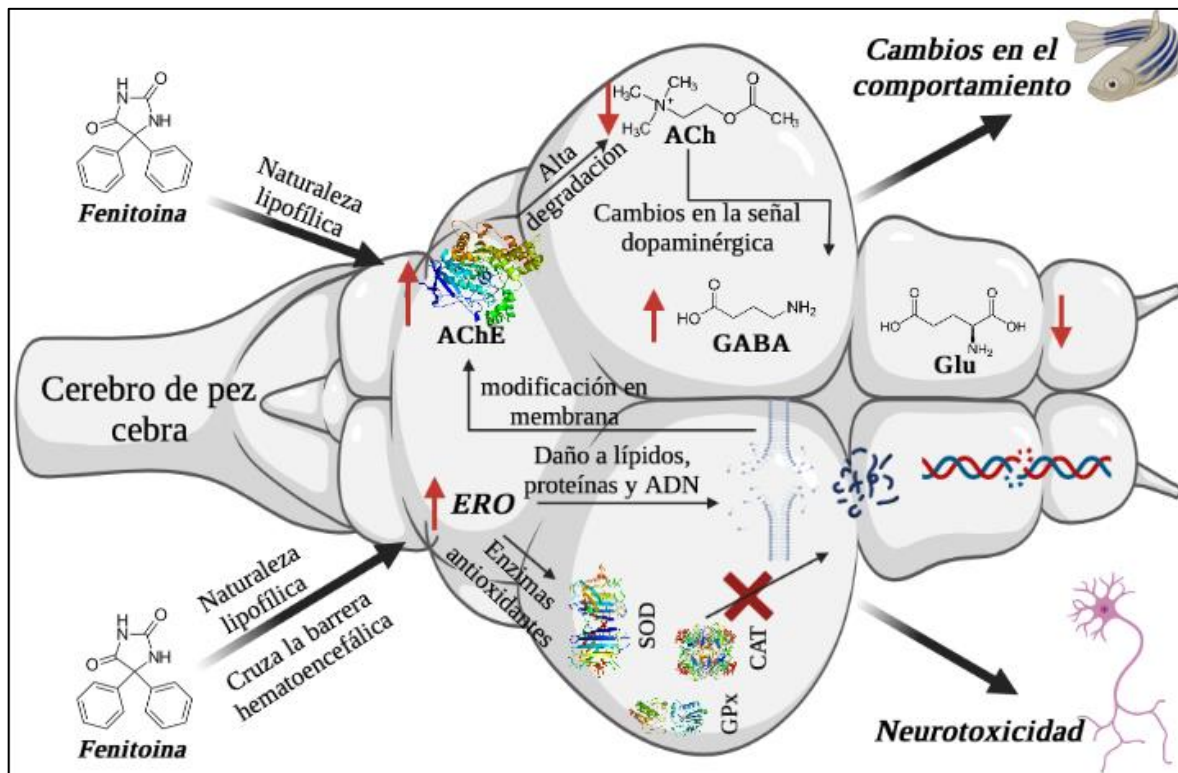


Figura 17. Posible mecanismo por el que la PHE induce neurotoxicidad en el pez cebra. El cerebro es especialmente vulnerable al daño oxidativo debido a su elevado consumo de oxígeno, su baja concentración de enzimas antioxidantes y su alto contenido en grasas poliinsaturadas. La PHE atraviesa la barrera hematoencefálica y sufre procesos de biotransformación, generando intermediarios reactivos, radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO). El aumento de los niveles de moléculas oxidativas induce la actividad de las enzimas antioxidantes, lo que sugiere cambios adaptativos al estado de estrés oxidativo. Sin embargo, la inducción de enzimas antioxidantes es insuficiente para asegurar la desintoxicación de las ERO y de los intermediarios reactivos generados. Esto conduce a un aumento de los niveles de lipoperoxidación, carbonilación de proteínas y contenido de hidroperóxidos. La oxidación de las biomoléculas provoca un cambio estructural y, en consecuencia, una pérdida de función. Por otra parte, la PHE puede actuar como agonista/antagonista en el receptor dopaminérgico, que desempeña un papel crucial en la regulación de la actividad locomotora. Además, la PHE tiene efectos en la relación entre el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el glutamato (Glu), lo que le confiere sus efectos ansiolíticos y anticonvulsivos. Por último, la AChE está estrechamente relacionada con las funciones sensoriales y locomotoras. El aumento de la actividad de la AChE se asocia con una elevada degradación de la acetilcolina y una disminución de los receptores de neurotransmisores, lo que provoca efectos adversos en las funciones motoras y cognitivas. Las modificaciones en las membranas lipídicas pueden ser responsables de la inducción de la actividad de la AChE.

Conclusiones

Este estudio demostró la toxicidad en el desarrollo de embriones/larvas de *D. rerio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de PHE, evidenciada por el retraso en el desarrollo, el retraso en la eclosión, las deformidades morfológicas y las alteraciones en los biomarcadores del estrés oxidativo. Los efectos teratogénicos y las alteraciones del desarrollo aumentaron en frecuencia y gravedad de forma dependiente del tiempo y la concentración. Los datos obtenidos en el estudio ayudan a proporcionar información sobre el mecanismo de la toxicidad y el estrés oxidativo inducidos por la PHE durante el desarrollo embrionario de *D. rerio*. Sugerimos que estas conclusiones puedan ser verificadas en otras especies acuáticas, utilizando concentraciones ambientalmente relevantes, para obtener información completa sobre la toxicidad del desarrollo de la PHE. Los resultados nos permiten concluir que la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de PHE genera efectos embriotóxicos, teratogénicos y de estrés oxidativo, generando riesgo para la integridad de *D. rerio*.

La exposición de *Danio rerio* a PHE alteró las actividades cerebrales de las enzimas antioxidantes, la AChE y los parámetros de comportamiento evaluados. La exposición de los peces a concentraciones ambientalmente relevantes del fármaco aumentó los biomarcadores de daño oxidativo de forma dependiente de la concentración. Además, el estrés oxidativo puede ser responsable del aumento de los niveles de AChE, lo que podría provocar un deterioro cognitivo y de la memoria, que no se evaluó en el estudio. Se sugieren futuros estudios conductuales crónicos para verificar esta posibilidad. Por lo tanto, este estudio contribuye a dilucidar los efectos de la PHE a concentraciones ambientalmente relevantes en el cerebro del pez cebra y las repercusiones en el comportamiento de este organismo, por lo tanto de gran relevancia ecológica.

Referencias bibliográficas

- Abe, F. R., de Oliveira, A. Á. S., Marino, R. V., Rialto, T. C. R., Oliveira, D. P., & Dorta, D. J. (2021). A comparison of developmental toxicity of brominated and halogen-free flame retardant on zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111745>
- Abou-Khalil, B. W. (2016). Antiepileptic drugs. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000289>
- Abramov, J. P., & Wells, P. G. (2011). Embryonic catalase protects against endogenous and phenytoin-enhanced DNA oxidation and embryopathies in acatalasemic and human catalase-expressing mice. *The FASEB Journal*, 25(7). <https://doi.org/10.1096/fj.11-182444>
- Ahrens, M. B. (2019). Zebrafish Neuroscience: Using Artificial Neural Networks to Help Understand Brains. *Current Biology*, 29(21), R1138–R1140. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.039>
- Ahrer, W., Scherwenk, E., & Buchberger, W. (2001). Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 910(1), 69–78. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01187-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01187-0)
- Albert, L. A. (2007). Contaminación ambiental. Origen, clases, fuentes y efectos. In *Introducción a la Toxicología Ambiental*.
- Aldenkamp, A. P., & Vermeulen, J. (1995). Phenytoin and carbamazepine: Differential effects on cognitive function. *Seizure: European Journal of Epilepsy*, 4(2). [https://doi.org/10.1016/S1059-1311\(95\)80088-3](https://doi.org/10.1016/S1059-1311(95)80088-3)
- Alidina, M., Hoppe-Jones, C., Yoon, M., Hamadeh, A. F., Li, D., & Drewes, J. E. (2014). The occurrence of emerging trace organic chemicals in wastewater effluents in Saudi Arabia. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.093>
- Almeida, Â., Calisto, V., Domingues, M. R. M., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Soares, A. M. V. M., ... Freitas, R. (2017). Comparison of the toxicological impacts of carbamazepine and a mixture of its photodegradation products in *Scrobicularia plana*. *Journal of Hazardous Materials*.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.009>

- Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., & Freitas, R. (2017). Toxicity associated to uptake and depuration of carbamazepine in the clam *Scrobicularia plana* under a chronic exposure. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.069>
- Almeida, Â., Freitas, R., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Soares, A. M. V. M., & Figueira, E. (2015). Chronic toxicity of the antiepileptic carbamazepine on the clam *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.004>
- Arnold, K. E., Brown, A. R., Brown, A. R., Ankley, G. T., & Sumpter, J. P. (2014). Medicating the environment: Assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0569>
- Arye, G., Dror, I., & Berkowitz, B. (2011). Fate and transport of carbamazepine in soil aquifer treatment (SAT) infiltration basin soils. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.062>
- Azzato, E. M., Chen, R. A., Wacholder, S., Chanock, S. J., Klebanoff, M. A., & Caporaso, N. E. (2010). Maternal EPHX1 polymorphisms and risk of phenytoin-induced congenital malformations. *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328334b6a3>
- Babić, S., & Mutavdžić Pavlović, D. (2013). Analysis of PhACs in solid environmental samples (soil, sediment, and sludge). In *Comprehensive Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62657-8.00005-7>
- Baftiu, A., Johannessen Landmark, C., Rusten, I. R., Feet, S. A., Johannessen, S. I., & Larsson, P. G. (2016). Changes in utilisation of antiepileptic drugs in epilepsy and non-epilepsy disorders—a pharmacoepidemiological study and clinical implications. *European Journal of Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00228-016-2092-3>
- Bai, X., Lutz, A., Carroll, R., Keteles, K., Dahlin, K., Murphy, M., & Nguyen, D. (2018). Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.106>

- Beghi, E. (2020). The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*, Vol. 54.
<https://doi.org/10.1159/000503831>
- Beliaeff, B., & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6).
<https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>
- Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P. (2007). Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Research*, 75(1). <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.03.015>
- Berman, E., Marom, E., Ekstein, D., Blatt, I., & Eyal, S. (2016). Utilization of antiepileptic drugs in Israel. *Epilepsy and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.05.004>
- Bernardo, H. T., Agostini, J. F., Toé, H. C. Z. D., Vieira, K. M., Baldin, S. L., Schuck, P. F., ... Rico, E. P. (2019). Cholinergic system and exploratory behavior are changed after weekly-binge ethanol exposure in zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 186, 172790. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.172790>
- Bernhard, M., Müller, J., & Knepper, T. P. (2006). Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.011>
- Besha, A. T., Gebreyohannes, A. Y., Tufa, R. A., Bekele, D. N., Curcio, E., & Giorno, L. (2017). Removal of emerging micropollutants by activated sludge process and membrane bioreactors and the effects of micropollutants on membrane fouling: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.04.027>
- Biel-Maeso, M., Baena-Nogueras, R. M., Corada-Fernández, C., & Lara-Martín, P. A. (2018). Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Science of the Total Environment*, 612, 649–659.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.279>
- Bilal, M., Mehmood, S., Rasheed, T., & Iqbal, H. M. N. (2020). Antibiotics traces in the aquatic environment: persistence and adverse environmental impact. *Current Opinion in Environmental Science and Health*.

<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.11.005>

- Biton, V., Montouris, G. D., Ritter, F., Riviello, J. J., Reife, R., Lim, P., & Pledger, G. (1999). A randomized, placebo-controlled study of topiramate in primary generalized tonic-clonic seizures. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.7.1330>
- Björlenius, B., Ripszám, M., Haglund, P., Lindberg, R. H., Tysklind, M., & Fick, J. (2018). Pharmaceutical residues are widespread in Baltic Sea coastal and offshore waters – Screening for pharmaceuticals and modelling of environmental concentrations of carbamazepine. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.276>
- Boillot, C., Martinez Bueno, M. J., Munaron, D., Le Dreau, M., Mathieu, O., David, A., ... Gomez, E. (2015). In vivo exposure of marine mussels to carbamazepine and 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazepine: Bioconcentration and metabolism. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.067>
- Bourgeois, B. F. D. (2000). Pharmacokinetic properties of current antiepileptic drugs: What improvements are needed? *Neurology*, 55(11 SUPPL. 3).
- Braakman, H. M., Verhoeven, J. S., Erasmus, C. E., Haaxma, C. A., Willemsen, M. H., & Schelhaas, H. J. (2017). Phenytoin as a last-resort treatment in SCN8A encephalopathy. *Epilepsia Open*, 2(3). <https://doi.org/10.1002/epi4.12059>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandão, F. P., Rodrigues, S., Castro, B. B., Gonçalves, F., Antunes, S. C., & Nunes, B. (2013). Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: Biochemical and behavioural effects. *Aquatic Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.005>
- Brigo, F., Bragazzi, N. L., Lattanzi, S., Nardone, R., & Trinka, E. (2018). A critical appraisal of randomized controlled trials on intravenous phenytoin in convulsive status epilepticus. *European Journal of Neurology*. <https://doi.org/10.1111/ene.13560>
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., & Klaminder, J. (2013). Dilute concentrations of a

- psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1226850>
- Brunsch, A. F., ter Laak, T. L., Rijnaarts, H., & Christoffels, E. (2018). Pharmaceutical concentration variability at sewage treatment plant outlets dominated by hydrology and other factors. *Environmental Pollution*.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.116>
- Brusseau, M. L., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2019). The Extent of Global Pollution. In *Environmental and Pollution Science* (3rd ed.). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814719-1.00001-x>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. In S. Fleischer & L. B. T.-M. in E. Packer (Eds.), *Biomembranes - Part C: Biological Oxidations* (Vol. 52, pp. 302–310). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Burcham, P. C. (2007). Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: A new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56(1), 18–22.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.02.015>
- Cachat, J., Kyzar, E. J., Collins, C., Gaikwad, S., Green, J., Roth, A., ... Kalueff, A. V. (2013). Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: The developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. *Behavioural Brain Research*, 236(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.041>
- Camacho-Muñoz, D., Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2010). Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain). *Journal of Hazardous Materials*.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.067>
- Canger, R., Battino, D., Canevini, M. P., Fumarola, C., Guidolin, L., Vignoli, A., ... Avanzini, G. (1999). Malformations in offspring of women with epilepsy: A prospective study. *Epilepsia*, 40(9). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1999.tb00851.x>
- Cardoso-Vera, J. D., Elizalde-Velázquez, G. A., Islas-Flores, H., Mejía-García, A., Ortega-Olvera, J. M., & Gómez-Oliván, L. M. (2021). A review of antiepileptic drugs: Part 1 occurrence, fate in aquatic environments and removal during different

- treatment technologies. *Science of the Total Environment*, Vol. 768.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145487>
- Carney, T. J., & Mosimann, C. (2018). Switch and Trace: Recombinase Genetics in Zebrafish. *Trends in Genetics*, 34(5), 362–378.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.01.004>
- Cenini, G., Lloret, A., & Cascella, R. (2019). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From a mitochondrial point of view. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2105607>
- Chakraborty, P., Mukhopadhyay, M., Sampath, S., Ramaswamy, B. R., Katsoyiannis, A., Cincinelli, A., & Snow, D. (2019). Organic micropollutants in the surface riverine sediment along the lower stretch of the transboundary river Ganga: Occurrences, sources and ecological risk assessment. *Environmental Pollution*, 249, 1071–1080.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.115>
- Chaudhary, N., Kabra, M., Gulati, S., Gupta, Y. K., Pandey, R. M., & Bhatia, B. D. (2016). Frequencies of CYP2C9 polymorphisms in North Indian population and their association with drug levels in children on phenytoin monotherapy. *BMC Pediatrics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12887-016-0603-0>
- Chen, F., Ying, G. G., Kong, L. X., Wang, L., Zhao, J. L., Zhou, L. J., & Zhang, L. J. (2011). Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.03.016>
- Chen, H., Liang, X., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., & Martyniuk, C. J. (2021). Environmentally relevant concentrations of sertraline disrupts behavior and the brain and liver transcriptome of juvenile yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*): Implications for the feeding and growth axis. *Journal of Hazardous Materials*, 409. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124974>
- Cheng, B., Jiang, F., Su, M., Zhou, L., Zhang, H., Cao, Z., ... Lu, H. (2020). Effects of lincomycin hydrochloride on the neurotoxicity of zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110725.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110725>
- Chhabra, R. S., Bucher, J. R., Haseman, J. K., Elwell, M. R., Kurtz, P. J., & Carlton, B.

- D. (1994). Comparative carcinogenicity of 5,5-diphenylhydantoin with or without perinatal exposure in rats and mice. *Toxicological Sciences*, Vol. 22.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/22.1.159>
- Chua, H. C., Venketasubramanian, N., Tjia, H., & Chan, S. P. (2000). Elimination of phenytoin in toxic overdose. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 102(1), 6–8.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0303-8467\(99\)00074-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0303-8467(99)00074-8)
- Cobley, J. N., Fiorello, M. L., & Bailey, D. M. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology*, Vol. 15.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>
- Collin, J., & Martin, P. (2017). *Chapter 13 - Zebrafish as a Research Organism: Danio rerio in Biomedical Research* (M. Jalali, F. Y. L. Saldanha, & M. B. T.-B. S. M. for C. R. Jalali, Eds.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00013-8>
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., & Wiegand, C. (2011). Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.017>
- Courtier, A., Cadiere, A., & Roig, B. (2019). Human pharmaceuticals: Why and how to reduce their presence in the environment. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 15, 77–82.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.11.001>
- Craig, S. (2005). Phenytoin poisoning. *Neurocritical Care*, Vol. 3.
<https://doi.org/10.1385/NCC:3:2:161>
- Cunha, D. L., de Araujo, F. G., & Marques, M. (2017). Psychoactive drugs: occurrence in aquatic environment, analytical methods, and ecotoxicity—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 24.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0170-4>
- da Silva Santos, N., Oliveira, R., Lisboa, C. A., Mona e Pinto, J., Sousa-Moura, D., Camargo, N. S., ... Domingues, I. (2018). Chronic effects of carbamazepine on zebrafish: Behavioral, reproductive and biochemical endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.015>
- da Silva Vilar, D., Torres, N. H., Bharagava, R. N., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., Salazar-

- Banda, G. R., ... Ferreira, L. F. R. (2021). Emerging contaminants in environment: occurrence, toxicity, and management strategies with emphasis on microbial remediation and advanced oxidation processes. In *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants* (pp. 1–14). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821199-1.00001-8>
- Danielsson, B. R., Johansson, A., Danielsson, C., Azarbayjani, F., Blomgren, B., & Sköld, A. C. (2005). Phenytoin teratogenicity: Hypoxia marker and effects on embryonic heart rhythm suggest an hERG-related mechanism. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 73(3). <https://doi.org/10.1002/bdra.20124>
- Dasgupta, A., & Krasowski, M. D. (2020). Chapter 9 - Antiepileptic drugs. In *Therapeutic Drug Monitoring Data (Fourth Edition)*.
- De Oliveira, J., Chadili, E., Turies, C., Brion, F., Cousin, X., & Hinfray, N. (2021). A comparison of behavioral and reproductive parameters between wild-type, transgenic and mutant zebrafish: Could they all be considered the same “zebrafish” for reglementary assays on endocrine disruption? *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108879>
- DeMott, J. M., Slocum, G. W., Gottlieb, M., & Peksa, G. D. (2020). Levetiracetam vs. phenytoin as 2nd-line treatment for status epilepticus: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsy and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107286>
- Dethloff, L. A., Graziano, M. J., Goldenthal, E., Gough, A., & de la Iglesia, F. A. (1996). Perspective on the carcinogenic potential of phenytoin based on rodent tumor bioassays and human epidemiological data. *Human & Experimental Toxicology*, 15(4). <https://doi.org/10.1177/096032719601500410>
- Dogan, D., Can, C., Kocyigit, A., Dikilitas, M., Taskin, A., & Bilinc, H. (2011). Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*, 84(1), 39–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.087>
- Dong, R., Yu, G., Guan, Y., Wang, B., Huang, J., Deng, S., & Wang, Y. (2016). Occurrence and discharge of pharmaceuticals and personal care products in

- dewatered sludge from WWTPs in Beijing and Shenzhen. *Emerging Contaminants*.
<https://doi.org/10.1016/j.emcon.2015.10.003>
- Du, B., Perez-Hurtado, P., Brooks, B. W., & Chambliss, C. K. (2012). Evaluation of an isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method for pharmaceuticals in fish. *Journal of Chromatography A*.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.026>
- Du, Bowen, Haddad, S. P., Scott, W. C., Chambliss, C. K., & Brooks, B. W. (2015). Pharmaceutical bioaccumulation by periphyton and snails in an effluent-dependent stream during an extreme drought. *Chemosphere*.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.044>
- Dubey, S., Ganeshpurkar, A., Bansal, D., & Dubey, N. (2015). Protective effect of rutin on impairment of cognitive functions of due to antiepileptic drugs on zebrafish model. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(1). <https://doi.org/10.4103/0253-7613.150357>
- Dulio, V., van Bavel, B., Brorström-Lundén, E., Harmsen, J., Hollender, J., Schlabach, M., ... Koschorreck, J. (2018). Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations. *Environmental Sciences Europe*, Vol. 30. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0135-3>
- Durán-Alvarez, J. C., Becerril-Bravo, E., Castro, V. S., Jiménez, B., & Gibson, R. (2009). The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.01.035>
- Eghbal, M. A., Taziki, S., & Sattari, M. R. (2014). Mechanisms of phenytoin-induced toxicity in freshly isolated rat hepatocytes and the protective effects of Taurine and/or Melatonin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 28(3).
<https://doi.org/10.1002/jbt.21542>
- Ekpeghere, K. I., Sim, W. J., Lee, H. J., & Oh, J. E. (2018). Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.218>

- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Eroğlu, E., Gökçil, Z., Bek, S., Ulaş, U. H., & Odabaşı, Z. (2008). Pregnancy and teratogenicity of antiepileptic drugs. *Acta Neurologica Belgica*, 108(2).
- Espinosa-Jovel, C., Toledano, R., Aledo-Serrano, Á., García-Morales, I., & Gil-Nagel, A. (2018). Epidemiological profile of epilepsy in low income populations. *Seizure*, Vol. 56. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.02.002>
- Faria, M., Ziv, T., Gómez-Canela, C., Ben-Lulu, S., Prats, E., Novoa-Luna, K. A., ... Raldúa, D. (2018). Acrylamide acute neurotoxicity in adult zebrafish. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26343-2>
- Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., & Van der Bruggen, B. (2019). Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072>
- Fenet, H., Mathieu, O., Mahjoub, O., Li, Z., Hillaire-Buys, D., Casellas, C., & Gomez, E. (2012). Carbamazepine, carbamazepine epoxide and dihydroxycarbamazepine sorption to soil and occurrence in a wastewater reuse site in Tunisia. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.050>
- Ferlemi, A. V., Avgoustatos, D., Kokkosis, A. G., Protonotarios, V., Constantinou, C., & Margarity, M. (2014). Lead-induced effects on learning/memory and fear/anxiety are correlated with disturbances in specific cholinesterase isoform activity and redox imbalance in adult brain. *Physiology and Behavior*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.04.033>
- Flohé, L., & Günzler, W. A. B. T.-M. in E. (1984). [12] Assays of glutathione peroxidase. In *Oxygen Radicals in Biological Systems* (Vol. 105, pp. 114–120). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)
- Fraz, S., Lee, A. H., Pollard, S., Srinivasan, K., Vermani, A., David, E., & Wilson, J. Y. (2019). Paternal Exposure to Carbamazepine Impacts Zebrafish Offspring Reproduction over Multiple Generations. *Environmental Science and Technology*.

<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03393>

- Freifeld, L., Odstrcil, I., Förster, D., Ramirez, A., Gagnon, J. A., Randlett, O., ... Boyden, E. S. (2017). Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and developmental biology studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(50), E10799–E10808. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706281114>
- Freyria, F. S., Sannino, F., & Bonelli, B. (2020). Common wastewater contaminants versus emerging ones. In *Nanomaterials for the Detection and Removal of Wastewater Pollutants*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818489-9.00002-5>
- Friedman, G. D., Jiang, S. F., Udaltsova, N., Quesenberry, C. P., Chan, J., & Habel, L. A. (2009). Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity. *International Journal of Cancer*, 125(9). <https://doi.org/10.1002/ijc.24545>
- Fuertes, I., Campos, B., Rivetti, C., Pinã, B., & Barata, C. (2019). Effects of Single and Combined Low Concentrations of Neuroactive Drugs on *Daphnia magna* Reproduction and Transcriptomic Responses. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03228>
- Gallop, K. (2010). Review article: Phenytoin use and efficacy in the ED: Review Article. *EMA - Emergency Medicine Australasia*, Vol. 22. <https://doi.org/10.1111/j.1742-6723.2010.01269.x>
- Gani, K. M., Hlongwa, N., Abunama, T., Kumari, S., & Bux, F. (2020). Emerging contaminants in South African water environment- a critical review of their occurrence, sources and ecotoxicological risks. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128737>
- Garbovsky, L. A., Drumheller, B. C., & Perrone, J. (2015). Purple Glove Syndrome after Phenytoin or Fosphenytoin Administration: Review of Reported Cases and Recommendations for Prevention. *Journal of Medical Toxicology*, Vol. 11. <https://doi.org/10.1007/s13181-015-0490-z>
- Garcia, S. N., Foster, M., Constantine, L. A., & Huggett, D. B. (2012). Field and laboratory fish tissue accumulation of the anti-convulsant drug carbamazepine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.013>

- Gauron, C., Meda, F., Dupont, E., Albadri, S., Quenech'Du, N., Ipendey, E., ... Vriz, S. (2016). Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Developmental Biology*, 414(2), 133–141.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.004>
- Genario, R., Giacomini, A. C. V. V., de Abreu, M. S., Marcon, L., Demin, K. A., & Kalueff, A. V. (2020). Sex differences in adult zebrafish anxiolytic-like responses to diazepam and melatonin. *Neuroscience Letters*.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134548>
- Gerlai, R. (2019). Reproducibility and replicability in zebrafish behavioral neuroscience research. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 178, 30–38.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.02.005>
- Gerlai, R. T. (2020). The design of behavioral screening in zebrafish. In *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817528-6.00029-2>
- Gibson, J. C. (2020). Emerging persistent chemicals in human biomonitoring for populations in the Arctic: A Canadian perspective. *Science of the Total Environment*, Vol. 708. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134538>
- Gibson, R., Durán-Álvarez, J. C., Estrada, K. L., Chávez, A., & Jiménez Cisneros, B. (2010). Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.006>
- Golovko, O., Rehl, A. L., Köhler, S., & Ahrens, L. (2020). Organic micropollutants in water and sediment from Lake Mälaren, Sweden. *Chemosphere*.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127293>
- Gorito, A. M., Ribeiro, A. R., Almeida, C. M. R., & Silva, A. M. T. (2017). A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation. *Environmental Pollution*, Vol. 227. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.060>
- Grabicova, K., Grabic, R., Fedorova, G., Fick, J., Cervený, D., Kolarova, J., ... Randak, T. (2017). Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.018>
- Guerriero, R. M., Giza, C. C., & Rotenberg, A. (2015). Glutamate and GABA Imbalance

- Following Traumatic Brain Injury. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, Vol. 15. <https://doi.org/10.1007/s11910-015-0545-1>
- Gupta, M., Patidar, Y., Khwaja, G. A., Chowdhury, D., Batra, A., & Dasgupta, A. (2013). Persistent cerebellar ataxia with cerebellar cognitive affective syndrome due to acute phenytoin intoxication: A case report. *Neurology Asia*, 18(1).
- Gurke, R., Rossmann, J., Schubert, S., Sandmann, T., Rößler, M., Oertel, R., & Fauler, J. (2015). Development of a SPE-HPLC-MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.008>
- Guruge, K. S., Goswami, P., Tanoue, R., Nomiya, K., Wijesekara, R. G. S., & Dharmaratne, T. S. (2019). First nationwide investigation and environmental risk assessment of 72 pharmaceuticals and personal care products from Sri Lankan surface waterways. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.042>
- Gwenzi, W., & Chaukura, N. (2018). Organic contaminants in African aquatic systems: Current knowledge, health risks, and future research directions. *Science of the Total Environment*, 619–620, 1493–1514. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.121>
- Hall, E. A., Wheless, J. W., & Phelps, S. J. (2020). Status epilepticus: The slow and agonizing death of phenytoin. *Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-25.1.4>
- Harris, C., Hiranruengchok, R., Lee, E., Berberian, R. M., & Eurich, G. E. (1995). Glutathione status in chemical embryotoxicity: Synthesis, turnover and adduct formation. *Toxicology in Vitro*, 9(5), 623–631. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0887-2333\(95\)00072-G](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0887-2333(95)00072-G)
- Hass, U., Duennbier, U., & Massmann, G. (2012). Occurrence and distribution of psychoactive compounds and their metabolites in the urban water cycle of Berlin (Germany). *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.025>
- Hatta, T., Ohmori, H., Murakami, T., Takano, M., Yamashita, K., & Yasuda, M. (1999). Neurotoxic effects of phenytoin on postnatal mouse brain development following

- neonatal administration. *Neurotoxicology and Teratology*, 21(1).
[https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(98\)00028-2](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(98)00028-2)
- He, Yide, Li, X., Jia, D., Zhang, W., Zhang, T., Yu, Y., ... Zhang, Y. (2019). A transcriptomics-based analysis of the toxicity mechanisms of gabapentin to zebrafish embryos at realistic environmental concentrations. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.063>
- He, Yujie, Sutton, N. B., Rijnaarts, H. H. H., & Langenhoff, A. A. M. (2016). Degradation of pharmaceuticals in wastewater using immobilized TiO₂ photocatalysis under simulated solar irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*.
<https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.09.015>
- 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. *Toxicology in Vitro*.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.005>
- Hilscherova, K., Blankenship, A. L., Nie, M., Coady, K. K., Upham, B. L., Trosko, J. E., & Giesy, J. P. (2003). Oxidative stress in liver and brain of the hatchling chicken (*Gallus domesticus*) following in ovo injection with TCDD. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 136(1).
[https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00167-4](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00167-4)
- Horzmann, K. A., & Freeman, J. L. (2016). Zebrafish get connected: Investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity. *Toxics*, Vol. 4.
<https://doi.org/10.3390/toxics4030019>
- Hoshina, K., Horiyama, S., Matsunaga, H., & Haginaka, J. (2009). Molecularly imprinted polymers for simultaneous determination of antiepileptics in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.071>
- Hossain, M. F. (2019). *Chapter 10 - Water pollution* (M. F. B. T.-S. D. for M. U. Hossain, Ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817690-0.00010-5>
- Hu, M., Hu, N., Ding, D., Zhao, W., Feng, Y., Zhang, H., ... Wang, Y. (2016). Developmental toxicity and oxidative stress induced by gamma irradiation in zebrafish embryos. *Radiation and Environmental Biophysics*, 55(4), 441–450.

<https://doi.org/10.1007/s00411-016-0663-4>

- Huerta-Fontela, M., Galceran, M. T., & Ventura, F. (2011). Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.036>
- Huerta, B., Jakimska, A., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2013). Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.001>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Imam, A., Sulaiman, N. A., Oyewole, A. L., Chengetanai, S., Williams, V., Ajibola, M. I., ... Ajao, M. S. (2018). Chlorpyrifos- and Dichlorvos-induced oxidative and neurogenic damage elicits neuro-cognitive deficits and increases anxiety-like behavior in wild-type rats. *Toxics*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/toxics6040071>
- Imam, S. H., Landry, K., Kaul, V., Gambhir, H., John, D., & Kloss, B. (2014). Free phenytoin toxicity. *American Journal of Emergency Medicine*, 32(10). <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2014.03.036>
- Information Services Division National Services Scotland, 2018. Prescribing & Medicines: Dispenser Payments and Prescription Cost Analysis. NHS National Services Scotland, Scotland Available at: <https://www.isdscotland.org/Health-Topics/Prescribing-and-Medicines/Community-Dispensing/Prescription-Cost-Analysis/>.
- Inman, S. L., Morford, L. L., Moran, M. S., & Vorhees, C. V. (1999). Prenatal phenytoin exposure and spatial navigation in offspring effects on reference and working memory and on discrimination learning. *Neurotoxicology and Teratology*, 21(5). [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00019-7)
- Ismail, N. A. H., Wee, S. Y., Kamarulzaman, N. H., & Aris, A. Z. (2019). Quantification of multi-classes of endocrine-disrupting compounds in estuarine water. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.089>

- Iturburu, F. G., Bertrand, L., Mendieta, J. R., Amé, M. V., & Menone, M. L. (2018). An integrated biomarker response study explains more than the sum of the parts: Oxidative stress in the fish *Australoheros facetus* exposed to imidacloprid. *Ecological Indicators*, *93*, 351–357.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.05.019>
- Jain, R. S., Nagpal, K., Kumar, S., Prakash, S., & Handa, R. (2015). Purple glove syndrome occurring after oral administration of phenytoin in therapeutic doses: Mechanism still a dilemma. *American Journal of Emergency Medicine*, *33*(1).
<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2014.05.039>
- Jang, J. J., Takahashi, M., Furukawa, F., Toyoda, K., Hasegawa, R., Sato, H., & Hayashi, Y. (1987). Long-term in vivo carcinogenicity study of phenytoin (5,5-diphenylhydantoin) in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, *25*(9).
[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(87\)90103-7](https://doi.org/10.1016/0278-6915(87)90103-7)
- Jiang, Z.-Y., 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. *Analytical Biochemistry*, *202*(2), 384–389.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N)
- Kalaiarasi, C., Sangeetha, P., Pavan, M. S., & Kumaradhas, P. (2018). Crystal structure and theoretical charge density studies of dilantin molecule. *Journal of Molecular Structure*, *1170*, 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.05.030>
- Kane, S. (2018). The Top 300 of 2019, ClinCalc DrugStats Database, Version 19.1.
- Kang, C. K., Kim, M. K., Kim, M. J., Jun, K. II, Kim, K. W., Park, S. H., & Song, K. H. (2013). Acute respiratory failure caused by phenytoin overdose. *Korean Journal of Internal Medicine*, Vol. 28. <https://doi.org/10.3904/kjim.2013.28.6.736>
- Kaplan, Y. C., & Demir, O. (2021). Use of Phenytoin, Phenobarbital Carbamazepine, Levetiracetam Lamotrigine and Valproate in Pregnancy and Breastfeeding: Risk of Major Malformations, Dose-dependency, Monotherapy vs Polytherapy, Pharmacokinetics and Clinical Implications. *Current Neuropharmacology*, *19*(11).
<https://doi.org/10.2174/1570159x19666210211150856>
- Kasapinovic, S., McCallum, G. P., Wiley, M. J., & Wells, P. G. (2004). The peroxy nitrite pathway in development: Phenytoin and benzo[a]pyrene embryopathies in

- inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(11). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.004>
- Keppel Hesselink, J. M. (2017). Phenytoin: a step by step insight into its multiple mechanisms of action—80 years of mechanistic studies in neuropharmacology. *Journal of Neurology*. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8465-4>
- Keppel Hesselink, J. M. (2018). Phenytoin repositioned in wound healing: clinical experience spanning 60 years. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.020>
- Khasawneh, O. F. S., & Palaniandy, P. (2021). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants. *Process Safety and Environmental Protection*, 150, 532–556. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.04.045>
- Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., & Snyder, S. A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.034>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kiura, Y., Hanaya, R., Serikawa, T., Kurisu, K., Sakai, N., & Sasa, M. (2003). Involvement of Ca²⁺ channels in abnormal excitability of hippocampal CA3 pyramidal cells in noda epileptic rats. *Journal Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1254/jphs.91.137>
- Klosterhaus, S. L., Grace, R., Hamilton, M. C., & Yee, D. (2013). Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environment International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.01.009>
- Koba, O., Golovko, O., Kodešová, R., Klement, A., & Grabic, R. (2016). Transformation of atenolol, metoprolol, and carbamazepine in soils: The identification, quantification, and stability of the transformation products and further implications for the environment. *Environmental Pollution*.

- <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.041>
- Kondor, A. C., Jakab, G., Vancsik, A., Filep, T., Szeberényi, J., Szabó, L., ... Szalai, Z. (2020). Occurrence of pharmaceuticals in the danube and drinking water wells: Efficiency of riverbank filtration. *Environmental Pollution*.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114893>
- Kopsky, D. J., & Hesselink, J. M. K. (2017). Topical phenytoin for the treatment of neuropathic pain. *Journal of Pain Research*. <https://doi.org/10.2147/JPR.S129749>
- Kumar, C. S., Vasudeva, N., Rao, D. V., & Naidu, C. R. S. A. (2020). Outcomes of topical phenytoin in the management of traumatic wounds. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2020.11.019>
- Kupsco, A., & Schlenk, D. (2015). Oxidative Stress, Unfolded Protein Response, and Apoptosis in Developmental Toxicity. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 317, pp. 1–66). <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.02.002>
- Kurvits, K., Laius, O., Uusküla, M., Haldre, S., & Rakitin, A. (2020). Valproic acid prescription trends among females of childbearing age in Estonia: A 14-year nationwide prescription database study. *Seizure*.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.01.004>
- Lamastra, L., Balderacchi, M., & Trevisan, M. (2016). Inclusion of emerging organic contaminants in groundwater monitoring plans. *MethodsX*, 3, 459–476.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2016.05.008>
- Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J. R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N. (Nil), ... Zhong, M. (2018). The Lancet Commission on pollution and health. *The Lancet*, Vol. 391. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)
- Landrigan, P. J., Fuller, R., Hu, H., Caravanos, J., Cropper, M. L., Hanrahan, D., ... Suk, W. A. (2018). Pollution and global health – An agenda for prevention. *Environmental Health Perspectives*, 126(8). <https://doi.org/10.1289/EHP3141>
- Lara-Martín, P. A., Renfro, A. A., Cochran, J. K., & Brownawell, B. J. (2015). Geochronologies of pharmaceuticals in a sewage-impacted estuarine urban setting (Jamaica Bay, New York). *Environmental Science and Technology*.
<https://doi.org/10.1021/es506009v>
- Laws, B. V., Dickenson, E. R. V., Johnson, T. A., Snyder, S. A., & Drewes, J. E. (2011).

- Attenuation of contaminants of emerging concern during surface-spreading aquifer recharge. *Science of the Total Environment*.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.11.021>
- Lee, O., Green, J. M., & Tyler, C. R. (2015). Transgenic fish systems and their application in ecotoxicology. *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 45.
<https://doi.org/10.3109/10408444.2014.965805>
- Lees, K., Fitzsimons, M., Snape, J., Tappin, A., & Comber, S. (2016). Pharmaceuticals in soils of lower income countries: Physico-chemical fate and risks from wastewater irrigation. *Environment International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.018>
- Léonard, A., de Meester, C., Fabry, L., de Saint-Georges, L., & Dumont, P. (1984). Lack of mutagenicity of diphenylhydantoin in in vitro short-term tests. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 137(2–3). [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(84\)90095-8](https://doi.org/10.1016/0165-1218(84)90095-8)
- Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology and Behavior*, 90(1).
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. B. T.-M. in E. (1994). [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Oxygen Radicals in Biological Systems Part C* (Vol. 233, pp. 346–357).
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- Li, L., Zhang, Y., Jia, L., Jia, D., Faramand, A., Chong, W., ... Fang, F. (2020). Levetiracetam versus phenytoin for the treatment of established status epilepticus: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Seizure*.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.03.002>
- Li, Y., Zhang, L., Ding, J., & Liu, X. (2020). Prioritization of pharmaceuticals in water environment in China based on environmental criteria and risk analysis of top-priority pharmaceuticals. *Journal of Environmental Management*, 253(October 2019), 109732. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109732>
- Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., ... Randak, T. (2011). Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic

- EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.008>
- Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., & Randak, T. (2009). Responses of antioxidant status and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, chronically treated with carbamazepine. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.031>
- Lingamaneni, R., & Hemmings, H. C. (1999). Effects of anticonvulsants on veratridine- and KCl-evoked glutamate release from rat cortical synaptosomes. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00810-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00810-1)
- Liu, C. S., Wu, H. M., Kao, S. H., & Wei, Y. H. (1998). Serum trace elements, glutathione, copper/zinc superoxide dismutase, and lipid peroxidation in epileptic patients with phenytoin or carbamazepine monotherapy. *Clinical Neuropharmacology*, 21(1).
- Liu, J., Lu, G., Xie, Z., Zhang, Z., Li, S., & Yan, Z. (2015). Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.033>
- Liu, L., & Wells, P. G. (1994). In vivo phenytoin-initiated oxidative damage to proteins and lipids in murine maternal hepatic and embryonic tissue organelles: Potential molecular targets of chemical teratogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 125(2). <https://doi.org/10.1006/taap.1994.1070>
- Liu, L., & Wells, P. G. (1995). DNA oxidation as a potential molecular mechanism mediating drug-induced birth defects: Phenytoin and structurally related teratogens initiate the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in vitro and in vivo in murine maternal hepatic and embryonic tissues. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(5). [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00082-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00082-9)
- Liu, M., Yin, H., & Wu, Q. (2019). Occurrence and health risk assessment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in tap water of Shanghai. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109497>
- Liu, X., Lin, J., Zhang, Y., Peng, X., Guo, N., & Li, Q. (2016). Effects of

- diphenylhydantoin on locomotion and thigmotaxis of larval zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.11.008>
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 42. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1)
- Mackay, D., Celsie, A. K. D., Powell, D. E., & Parnis, J. M. (2018). Bioconcentration, bioaccumulation, biomagnification and trophic magnification: A modelling perspective. *Environmental Science: Processes and Impacts*. <https://doi.org/10.1039/c7em00485k>
- Madikizela, L. M., Tavengwa, N. T., & Chimuka, L. (2017). Status of pharmaceuticals in African water bodies: Occurrence, removal and analytical methods. *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.022>
- Maeda, T., Sano, N., Toge, K., Shibata, M., Izumi, K., & Otsuka, H. (1988). Lack of carcinogenicity of phenytoin in (C57bl/6 × c3h)f1 mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 24(1). <https://doi.org/10.1080/15287398809531144>
- Mahle, C., & Dasgupta, A. (1997). Decreased total antioxidant capacity and elevated lipid hydroperoxide concentrations in sera of epileptic patients receiving phenytoin. *Life Sciences*, 61(4), 437–443. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)00401-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)00401-3)
- Majumder, A., Gupta, B., & Gupta, A. K. (2019). Pharmaceutically active compounds in aqueous environment: A status, toxicity and insights of remediation. *Environmental Research*, 176, 108542. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108542>
- Malarvizhi, A., Kavitha, C., Saravanan, M., & Ramesh, M. (2012). Carbamazepine (CBZ) induced enzymatic stress in gill, liver and muscle of a common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2011.01.001>
- Margenat, A., Matamoros, V., Díez, S., Cañameras, N., Comas, J., & Bayona, J. M. (2017). Occurrence of chemical contaminants in peri-urban agricultural irrigation waters and assessment of their phytotoxicity and crop productivity. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.025>

- Martin, E., Gambertoglio, J. G., Tozer, T. N., Roman, L. A., Adler, D. S., & Grausz, H. (1977). Removal of Phenytoin by Hemodialysis in Uremic Patients. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 238(16).
<https://doi.org/10.1001/jama.1977.03280170044025>
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 40–47.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.068>
- Martínez-Piernas, A. B., Plaza-Bolaños, P., García-Gómez, E., Fernández-Ibáñez, P., & Agüera, A. (2018). Determination of organic microcontaminants in agricultural soils irrigated with reclaimed wastewater: Target and suspect approaches. *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.049>
- Martínez Bueno, M. J., Boillot, C., Fenet, H., Chiron, S., Casellas, C., & Gómez, E. (2013). Fast and easy extraction combined with high resolution-mass spectrometry for residue analysis of two anticonvulsants and their transformation products in marine mussels. *Journal of Chromatography A*.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.071>
- Martinez, C. S., Feas, D. A., Siri, M., Igartúa, D. E., Chiaramoni, N. S., del, S., & Prieto, M. J. (2018). In vivo study of teratogenic and anticonvulsant effects of antiepileptics drugs in zebrafish embryo and larvae. *Neurotoxicology and Teratology*.
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.01.008>
- Maruya, K. A., Vidal-Dorsch, D. E., Bay, S. M., Kwon, J. W., Xia, K., & Armbrust, K. L. (2012). Organic contaminants of emerging concern in sediments and flatfish collected near outfalls discharging treated wastewater effluent to the Southern California Bight. *Environmental Toxicology and Chemistry*.
<https://doi.org/10.1002/etc.2003>
- Mason, B. J., Quello, S., & Shadan, F. (2018). Gabapentin for the treatment of alcohol use disorder. *Expert Opinion on Investigational Drugs*.
<https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1417383>
- Matić Bujagić, I., Grujić, S., Laušević, M., Hofmann, T., & Micić, V. (2019). Emerging

- contaminants in sediment core from the Iron Gate I Reservoir on the Danube River. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.205>
- Matongo, S., Birungi, G., Moodley, B., & Ndungu, P. (2015). Occurrence of selected pharmaceuticals in water and sediment of Umgeni River, KwaZulu-Natal, South Africa. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4217-0>
- Matsuda, K., Kang, K. S., Sakashita, A., Yahashi, S., & Vaudry, H. (2011). Behavioral effect of neuropeptides related to feeding regulation in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1220(1). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05884.x>
- Maximino, C., Benzecry, R., Matos Oliveira, K. R., De Jesus Oliveira Batista, E., Herculano, A. M., Broock Rosemberg, D., ... Blaser, R. (2012). A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. *Behaviour*, Vol. 149. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003029>
- Meldrum, B. S., & Rogawski, M. A. (2007). Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. *Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2006.11.010>
- Melvin, S. D., Cameron, M. C., & Lanctôt, C. M. (2014). Individual and mixture toxicity of pharmaceuticals naproxen, carbamazepine, and sulfamethoxazole to Australian striped marsh frog tadpoles (*Limnodynastes peronii*). *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.865107>
- Métais, I., Châtel, A., Mouloud, M., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Gillet, P., ... Mouneyrac, C. (2019). Is there a link between acetylcholinesterase, behaviour and density populations of the ragworm *Hediste diversicolor*? *Marine Pollution Bulletin*, 142, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.026>
- Meyers, J. R. (2018). Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 16(1), e19. <https://doi.org/10.1002/cpet.19>
- Mijangos, L., Ziarrusta, H., Ros, O., Kortazar, L., Fernández, L. A., Olivares, M., ... Etxebarria, N. (2018). Occurrence of emerging pollutants in estuaries of the Basque Country: Analysis of sources and distribution, and assessment of the environmental risk. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.033>

- Mishra, A., & Goe, R. K. (2015). Comparative behavioral and neurochemical analysis of phenytoin and valproate treatment on epilepsy induced learning and memory deficit: Search for add on therap. *Metabolic Brain Disease*, 30(4).
<https://doi.org/10.1007/s11011-015-9650-8>
- Mishra, D., Sharma, S., Sankhyan, N., Konanki, R., Kamate, M., Kanhere, S., & Aneja, S. (2014). Consensus guidelines on management of childhood convulsive status epilepticus. *Indian Pediatrics*. <https://doi.org/10.1007/s13312-014-0543-4>
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9)
- Mohan, A. J., & Krishna, K. L. (2018). Memory impairment allied to temporal lobe epilepsy and its deterioration by phenytoin: A highlight on ameliorative effects of levetiracetam in mouse model. *International Journal of Epilepsy*, 5(1).
<https://doi.org/10.1055/s-0038-1656714>
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Huerta, B., Barceló, D., & León, V. M. (2016). Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon? *Environmental Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.001>
- Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Gómez-Amores, L., Mate, A., Vazquez, C. M., & Cameán, A. M. (2005). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol*, 45(4). <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2004.11.001>
- Morone, A., Mulay, P., & Kamble, S. P. (2019). Removal of pharmaceutical and personal care products from wastewater using advanced materials. In *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology Emerging Contaminants and Micro Pollutants*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00008-1>
- Munns, A. J., De Voss, J. J., Hooper, W. D., Dickinson, R. G., & Gillam, E. M. J. (1997). Bioactivation of phenytoin by human cytochrome P450: Characterization of the mechanism and targets of covalent adduct formation. *Chemical Research in*

- Toxicology*, 10(9). <https://doi.org/10.1021/tx9700836>
- Mulholland, A., 2018. Prescription Cost Analysis Northern Ireland 2017. Information and Registration Unit Family Practitioner Services Business Services Organization. Belfast Available at: <http://www.hscbusiness.hscni.net/services/3032.htm>.
- Muralikrishna, I. V., & Manickam, V. (2017). Analytical Methods for Monitoring Environmental Pollution. In *Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811989-1.00018-x>
- Muthulakshmi, S., Maharajan, K., Habibi, H. R., Kadirvelu, K., & Venkataramana, M. (2018). Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): Role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. *Chemosphere*, 198, 111–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.141>
- Na, T. W., Kang, T. W., Lee, K. H., Hwang, S. H., Jung, H. J., & Kim, K. (2019). Distribution and ecological risk of pharmaceuticals in surface water of the Yeongsan river, Republic of Korea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181(May), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.06.004>
- Nalisetty, S., Kandasamy, S., Sridharan, B., Vijayakumar, V., Sangaralingam, T., & Krishnamoorthi, N. (2020). Clinical Effectiveness of Levetiracetam Compared to Fosphenytoin in the Treatment of Benzodiazepine Refractory Convulsive Status Epilepticus. *Indian Journal of Pediatrics*. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03221-2>
- National Statistics Ystadegau Gwladol, 2018. Prescriptions dispensed in the community: 2017. Welsh Government, Cardiff Available at: <https://gov.wales/sites/default/files/statistics-and-research/2018-12/180523-prescriptions-dispensed-community-2017>.
- Nawaz, T., & Sengupta, S. (2018). Chapter 4 - Contaminants of Emerging Concern: Occurrence, Fate, and Remediation. In *Advances in Water Purification Techniques: Meeting the Needs of Developed and Developing Countries*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814790-0.00004-1>
- Nieto, E., Corada-Fernández, C., Hampel, M., Lara-Martín, P. A., Sánchez-Argüello, P., & Blasco, J. (2017). Effects of exposure to pharmaceuticals (diclofenac and carbamazepine) spiked sediments in the midge, *Chironomus riparius* (Diptera,

- Chironomidae). *Science of the Total Environment*.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.171>
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Yang, H., & Dong, H. (2019). Bioconcentration of the antiepileptic drug carbamazepine and its physiological and biochemical effects on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.061>
- OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing*.
- Okogbaa, J. I., Onor, I. O., Arije, O. A., Harris, M. B., & Lillis, R. A. (2015). Phenytoin-induced purple glove syndrome: A case report and review of the literature. *Hospital Pharmacy*, Vol. 50. <https://doi.org/10.1310/hpj5005-391>
- Oliveira, P., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Wrona, F. J., ... Freitas, R. (2017). Physiological and biochemical alterations induced in the mussel *Mytilus galloprovincialis* after short and long-term exposure to carbamazepine. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.052>
- Oliveira, T. S., Murphy, M., Mendola, N., Wong, V., Carlson, D., & Waring, L. (2015). Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.104>
- Overturf, C. L., Overturf, M. D., & Huggett, D. B. (2016). Bioconcentration and endocrine disruption effects of diazepam in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.02.001>
- Park, S., & Lee, W. (2018). Removal of selected pharmaceuticals and personal care products in reclaimed water during simulated managed aquifer recharge. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.221>
- Parman, T., Chen, G., & Wells, P. G. (1998). Free radical intermediates of phenytoin and related teratogens: Prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation, electron paramagnetic resonance spectrometry, and photochemical product analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(39). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.25079>
- Parvez, S., & Raisuddin, S. (2005). Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to

- oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(1), 112–117.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.11.002>
- Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C. U., & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical Reviews*.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>
- Patocka, J., Wu, Q., Nepovimova, E., & Kuca, K. (2020). Phenytoin – An anti-seizure drug: Overview of its chemistry, pharmacology and toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 142. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111393>
- Paz, A., Tadmor, G., Malchi, T., Blotevogel, J., Borch, T., Polubesova, T., & Chefetz, B. (2016). Fate of carbamazepine, its metabolites, and lamotrigine in soils irrigated with reclaimed wastewater: Sorption, leaching and plant uptake. *Chemosphere*.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.048>
- Perucca, E. (2006). Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, Vol. 61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2005.02529.x>
- Pestana, R. R. F., Kinjo, E. R., Hernandez, M. S., & Britto, L. R. G. (2010). Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase are involved in neurodegeneration in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience Letters*, 484(3).
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.049>
- Phoon, B. L., Ong, C. C., Mohamed Saheed, M. S., Show, P.-L., Chang, J.-S., Ling, T. C., ... Juan, J. C. (2020). Conventional and emerging technologies for removal of antibiotics from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 400, 122961.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122961>
- Pi, N., Ng, J. Z., & Kelly, B. C. (2017). Bioaccumulation of pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting chemicals in aquatic macrophytes: Results of hydroponic experiments with *Echinodorus horemanii* and *Eichhornia crassipes*. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.137>
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., & Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and

- Behavior. *Neuron*, Vol. 76. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>
- Pidoplichko, V. I., Prager, E. M., Aroniadou-Anderjaska, V., & Braga, M. F. M. (2013). $\alpha 7$ -Containing nicotinic acetylcholine receptors on interneurons of the basolateral amygdala and their role in the regulation of the network excitability. *Journal of Neurophysiology*, 110(10). <https://doi.org/10.1152/jn.01030.2012>
- Pieróg, M., Socała, K., Doboszevska, U., Wyska, E., Guz, L., Szopa, A., ... Wlaź, P. (2021). Effects of classic antiseizure drugs on seizure activity and anxiety-like behavior in adult zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 415, 115429. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115429>
- Pilli, S., Sellamuthu, B., Pandey, A. K., & Tyagi, R. D. (2020). Treatment of wastewater containing pharmaceuticals: biological treatment. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819722-6.00013-4>
- Pistocchi, A., Dorati, C., Aloe, A., Ginebreda, A., & Marcé', R. (2019). River pollution by priority chemical substances under the Water Framework Directive: A provisional pan-European assessment. *Science of the Total Environment*, 662. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.354>
- Pitchai, A., Rajaretinam, R. K., & Freeman, J. L. (2019). Zebrafish as an Emerging Model for Bioassay-Guided Natural Product Drug Discovery for Neurological Disorders. *Medicines*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/medicines6020061>
- Pivetta, R. C., Rodrigues-Silva, C., Ribeiro, A. R., & Rath, S. (2020). Tracking the occurrence of psychotropic pharmaceuticals in Brazilian wastewater treatment plants and surface water, with assessment of environmental risks. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138661>
- Pohl, J. (2019). Zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larvae locomotor activity data analysis: Evaluating anxiolytic effects of the antidepressant compound citalopram. *Data in Brief*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104812>
- Poolos, N. P., Migliore, M., & Johnston, D. (2002). Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn891>
- Postlethwait, J. H., & Braasch, I. (2020). Zebrafish Genetics. In *The Zebrafish in*

Biomedical Research (pp. 25–39). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00003-8>

Praveen-kumar, S., & Desai, M. (2014). Ocular motor abnormalities in a patient with phenytoin toxicity — Case report and minireview. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 127, 116–117.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2014.10.004>

Prescribing and Medicines Team Health and Social Care Information Centre, 2018. Prescriptions Dispensed in the Community - Statistics for England, 2007-2017. Health and Social Care Information Centre, UK Available at: <https://digital.nhs.uk/data-and-information/publications/statistical/prescriptions-dispensed-in-the-community/prescriptions-dispensed-in-the-community-england—2007—2017>.

Pullaguri, N., Grover, P., Abhishek, S., Rajakumara, E., Bhargava, Y., & Bhargava, A. (2021). Triclosan affects motor function in zebrafish larva by inhibiting ache and syn2a genes. *Chemosphere*, 266, 128930.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128930>

Qiang, L., Cheng, J., Yi, J., Rotchell, J. M., Zhu, X., & Zhou, J. (2016). Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1694-y>

Qiu, H. (2011). Migration Mechanism of Organic Pollutants in National Water-body Sediments. *Journal of Geography and Geology*.

<https://doi.org/10.5539/jgg.v3n1p239>

Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., & Freeman, B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028–22034. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54740-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54740-2)

Raftopoulos, R., Hickman, S. J., Toosy, A., Sharrack, B., Mallik, S., Paling, D., ... Kapoor, R. (2016). Phenytoin for neuroprotection in patients with acute optic neuritis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00004-1)

Raghunath, A., & Perumal, E. (2018). Analysis of lethality and malformations during zebrafish (*Danio rerio*) development. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1797).

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7883-0_18

- Ramesh, M., Angitha, S., Haritha, S., Poopal, R.-K., Ren, Z., & Umamaheswari, S. (2020). Organophosphorus flame retardant induced hepatotoxicity and brain AChE inhibition on zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*, *82*, 106919. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ntt.2020.106919>
- Reeta, K. H., Mehla, J., & Gupta, Y. K. (2009). Curcumin is protective against phenytoin-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Brain Research*, *1301*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.027>
- Richetti, S. K., Rosemberg, D. B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J. M., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2011). Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *NeuroToxicology*, *32*(1). <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.11.001>
- Riedel, L., & Obe, G. (1984). Mutagenicity of antiepileptic drugs II. Phenytoin, primidone and phenobarbital. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, *138*(1). [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(84\)90087-9](https://doi.org/10.1016/0165-1218(84)90087-9)
- Ritchie, H. E., Oakes, D., Farrell, E., Ababneh, D., & Howe, A. (2019). Fetal hypoxia and hyperglycemia in the formation of phenytoin-induced cleft lip and maxillary hypoplasia. *Epilepsia Open*, *4*(3). <https://doi.org/10.1002/epi4.12352>
- Rivera-Jaimes, J. A., Postigo, C., Melgoza-Alemán, R. M., Aceña, J., Barceló, D., & López de Alda, M. (2018). Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, *613–614*, 1263–1274. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.134>
- Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M. Á., Prados-Joya, G., & Ocampo-Pérez, R. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*, *93*(7), 1268–1287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059>
- Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., & Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106>
- Rogawski, M. A., & Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs for the

- treatment of nonepileptic conditions. *Nature Medicine*.
<https://doi.org/10.1038/nm1074>
- Rutecki, P. A. (1995). Noradrenergic modulation of epileptiform activity in the hippocampus. *Epilepsy Research*. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(94\)00078-B](https://doi.org/10.1016/0920-1211(94)00078-B)
- Sanchez, W., Burgeot, T., & Porcher, J. M. (2013). A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5). <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
- Sander, J. W. (2004). The use of antiepileptic drugs - Principles and practice. *Epilepsia*, 45(SUPPL. 6). <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.455005.x>
- Santos, D., Vieira, R., Luzio, A., & Félix, L. (2018). Zebrafish Early Life Stages for Toxicological Screening: Insights From Molecular and Biochemical Markers. In *Advances in Molecular Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64199-1.00007-5>
- Santos, L. H. M. L. M., Ramalhosa, M. J., Ferreira, M., & Delerue-Matos, C. (2016). Development of a modified acetonitrile-based extraction procedure followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of psychiatric drugs in sediments. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.079>
- Sarkar, S., Mukherjee, S., Chattopadhyay, A., & Bhattacharya, S. (2014). Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebrafish brain: Expression of antioxidant genes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.012>
- Sathishkumar, P., Meena, R. A. A., Palanisami, T., Ashokkumar, V., Palvannan, T., & Gu, F. L. (2020). Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Science of the Total Environment*, 698, 134057. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134057>
- Schaider, L. A., Rudel, R. A., Ackerman, J. M., Dunagan, S. C., & Brody, J. G. (2014). Pharmaceuticals, perfluorosurfactants, and other organic wastewater compounds in public drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.067>
- Scott, W. C., Haddad, S. P., Saari, G. N., Chambliss, C. K., Conkle, J. L., Matson, C.

- W., & Brooks, B. W. (2019). Influence of salinity and pH on bioconcentration of ionizable pharmaceuticals by the gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.188>
- Senger, M. R., Seibt, K. J., Ghisleni, G. C., Dias, R. D., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2011). Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Cell Biology and Toxicology*, 27(3). <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9181-y>
- Seok, S. H., Baek, M. W., Lee, H. Y., Kim, D. J., Na, Y. R., Noh, K. J., ... Park, J. H. (2008). In vivo alternative testing with zebrafish in ecotoxicology. *Journal of Veterinary Science*, 9(4). <https://doi.org/10.4142/jvs.2008.9.4.351>
- Severo, E. S., Marins, A. T., Cerezer, C., Costa, D., Nunes, M., Prestes, O. D., ... Loro, V. L. (2020). Ecological risk of pesticide contamination in a Brazilian river located near a rural area: A study of biomarkers using zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110071. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110071>
- Sezzano, P., Raimondi, A., Arboix, M., & Pantarotto, C. (1982). Mutagenicity of diphenylhydantoin and some of its metabolites towards *Salmonella typhimurium* strains. *Mutation Research Letters*, 103(3–6). [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(82\)90046-X](https://doi.org/10.1016/0165-7992(82)90046-X)
- Shahid, M., Pillai, K. K., & Vohora, D. (2004). Reversal of phenytoin-induced impairment of spontaneous alternation by piracetam in mice: Involvement of cholinergic system. *Indian Journal of Pharmacology*, 36(1).
- Shanmugarajah, P. D., Hoggard, N., Aeschlimann, D. P., Aeschlimann, P. C., Dennis, G. J., Howell, S. J., ... Hadjivassiliou, M. (2018). Phenytoin-related ataxia in patients with epilepsy: clinical and radiological characteristics. *Seizure*, 56, 26–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.01.019>
- SIES, H. (1985). Oxidative Stress: Introductory Remarks. In *Oxidative Stress*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-642760-8.50005-3>
- Sies, H., & Jones, D. (2007). Oxidative Stress. In G. B. T.-E. of S. (Second E. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (pp. 45–48). <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00285-3>

- Simão, F. C. P., Martínez-Jerónimo, F., Blasco, V., Moreno, F., Porta, J. M., Pestana, J. L. T., ... Barata, C. (2019). Using a new high-throughput video-tracking platform to assess behavioural changes in *Daphnia magna* exposed to neuro-active drugs. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.187>
- 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 Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.059>
- Şimşek, G., Ciftci, O., Karadag, N., Karatas, E., & Kizilay, A. (2014). Effects of topical phenytoin on nasal wound healing after mechanical trauma: An experimental study. *Laryngoscope*. <https://doi.org/10.1002/lary.24811>
- Singh, G., Driever, P. H., & Sander, J. W. (2005). Cancer risk in people with epilepsy: The role of antiepileptic drugs. *Brain*, Vol. 128. <https://doi.org/10.1093/brain/awh363>
- Soontornpun, A., Manoyana, N., Apaijai, N., Pinyopornpanish, K., Pinyopornpanish, K., Nadsasarn, A., ... Chattipakorn, S. C. (2020). Influenza immunization does not predominantly alter levels of phenytoin, and cytochrome P-450 enzymes in epileptic patients receiving phenytoin monotherapy. *Epilepsy Research*. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2020.106471>
- Srinivasan, G., Wyawahare, M., Mathen, P. G., & Subrahmanyam, D. K. (2015). Life-threatening bradyarrhythmia with oral phenytoin overdose. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 6(3). <https://doi.org/10.4103/0976-500X.162017>
- Stefan, H., & Feuerstein, T. J. (2007). Novel anticonvulsant drugs. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.07.005>
- Sudha, S., Lakshmana, M. K., & Pradhan, N. (1995). Chronic phenytoin induced impairment of learning and memory with associated changes in brain acetylcholine esterase activity and monoamine levels. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 52(1). [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00059-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00059-6)
- Sun, Y., Liu, J., & Lu, G. (2020). Influence of aquatic colloids on the bioaccumulation and biological effects of diclofenac in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and*

- Environmental Safety*, 195. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110470>
- Tadkaew, N., Hai, F. I., McDonald, J. A., Khan, S. J., & Nghiem, L. D. (2011). Removal of trace organics by MBR treatment: The role of molecular properties. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.01.023>
- Taheran, M., Naghdi, M., Brar, S. K., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2018). Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.010>
- Taziki, S., Sattari, M. R., & Eghbal, M. A. (2013). Mechanisms of trazodone-induced cytotoxicity and the protective effects of melatonin and/or taurine toward freshly isolated rat hepatocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 27(10). <https://doi.org/10.1002/jbt.21509>
- Teodosiu, C., Gilca, A.-F., Barjoveanu, G., & Fiore, S. (2018). Emerging pollutants removal through advanced drinking water treatment: A review on processes and environmental performances assessment. *Journal of Cleaner Production*, 197, 1210–1221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.247>
- Thelusmond, J. R., Kawka, E., Strathmann, T. J., & Cupples, A. M. (2018). Diclofenac, carbamazepine and triclocarban biodegradation in agricultural soils and the microorganisms and metabolic pathways affected. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.403>
- Tomson, T., Battino, D., Bonizzoni, E., Craig, J., Lindhout, D., Perucca, E., ... Zarifi-Oskoie, M. (2018). Comparative risk of major congenital malformations with eight different antiepileptic drugs: a prospective cohort study of the EURAP registry. *The Lancet Neurology*, 17(6). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30107-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30107-8)
- Tondera, K., Blecken, G.-T., Tournebize, J., Viklander, M., Österlund, H., Andersson Wikström, A., & Tanner, C. C. (2018). *Emerging Contaminants: Occurrence, Treatment Efficiency and Accumulation Under Varying Flows*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70013-7_6
- Tonelli, D. A. G., Pereira, M., Siba, I. P., Martynhak, B. J., Correia, D., Casarotto, P. C., ... Andreatini, R. (2013). The antimanic-like effect of phenytoin and carbamazepine on methylphenidate-induced hyperlocomotion: Role of voltage-gated sodium channels. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 27(6).

<https://doi.org/10.1111/fcp.12022>

- Tran, N. H., Reinhard, M., & Gin, K. Y. H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>
- Trevor, A., Katzung, B., & Masters, S. (2019). Katzung & Trevor's Pharmacology Examination & Board Review. In *Katzung & Trevor's Pharmacology Examination and Board Review: Twelfth Edition*.
- Turner, T. J. (1998). Calcium channels coupled to glutamate release. *Progress in Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)60426-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)60426-4)
- Ukaogo, P. O., Ewuzie, U., & Onwuka, C. V. (2020). Environmental pollution: causes, effects, and the remedies. In *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819001-2.00021-8>
- Valdés, M. E., Amé, M. V., Bistoni, M. de los A., & Wunderlin, D. A. (2014). Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquia River basin (Córdoba, Argentina). *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.124>
- Vanderford, B. J., & Snyder, S. A. (2006). Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es0613198>
- Vasilopoulou, C. G., Constantinou, C., Giannakopoulou, D., Giompres, P., & Margarity, M. (2016). Effect of adult onset hypothyroidism on behavioral parameters and acetylcholinesterase isoforms activity in specific brain regions of male mice. *Physiology and Behavior*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.06.016>
- Vazquez-Roig, P., Segarra, R., Blasco, C., Andreu, V., & Picó, Y. (2010). Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.033>
- Vernouillet, G., Eullaffroy, P., Lajeunesse, A., Blaise, C., Gagné, F., & Juneau, P. (2010). Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.010>

- Villegas- Guzman, P., Giannakis, S., Rtimi, S., Grandjean, D., Bensimon, M., de Alencastro, L. F., ... Pulgarin, C. (2017). A green solar photo-Fenton process for the elimination of bacteria and micropollutants in municipal wastewater treatment using mineral iron and natural organic acids. *Applied Catalysis B: Environmental*. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.07.066>
- Volgin, A. D., Yakovlev, O. A., Demin, K. A., de Abreu, M. S., Alekseeva, P. A., Friend, A. J., ... Kalueff, A. V. (2019). Zebrafish models for personalized psychiatry: Insights from individual, strain and sex differences, and modeling gene x environment interactions. *Journal of Neuroscience Research*, 97(4), 402–413. <https://doi.org/10.1002/jnr.24337>
- Vorhees, C. V., & Minck, D. R. (1989). Long-term effects of prenatal phenytoin exposure on offspring behavior in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 11(3). [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(89\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0892-0362(89)90072-X)
- Walker, C., Choi, S. (Claudia), & Ray, S. D. (2019). Anti-epileptic medications. In *Side Effects of Drugs Annual*. <https://doi.org/10.1016/bs.seda.2019.10.003>
- Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., & Broschard, T. H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.004>
- Wilkinson, J., Hooda, P. S., Barker, J., Barton, S., & Swinden, J. (2017). Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.032>
- Winn, L. M., Kim, P. M., & Nickoloff, J. A. (2003). Oxidative stress-induced homologous recombination as a novel mechanism for phenytoin-initiated toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2). <https://doi.org/10.1124/jpet.103.052639>
- Winn, L. M., & Wells, P. G. (1997). Evidence for embryonic prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation and reactive oxygen species-mediated oxidation of cellular macromolecules in phenytoin and benzo[a]pyrene teratogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(4). [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00340-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00340-1)
- Wu, C., Spongberg, A. L., Witter, J. D., Fang, M., & Czajkowski, K. P. (2010). Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied

- with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es1011115>
- Wu, P., Liu, Y., Jiang, W. D., Jiang, J., Zhao, J., Zhang, Y. A., ... Feng, L. (2017). A comparative study on antioxidant system in fish hepatopancreas and intestine affected by choline deficiency: Different change patterns of varied antioxidant enzyme genes and nrf2 signaling factors. *PLoS ONE*, *12*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169888>
- Xia, L., Zheng, L., & Zhou, J. L. (2017). Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, *182*, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.054>
- Xia, S., Zhu, X., Yan, Y., Zhang, T., Chen, G., Lei, D., & Wang, G. (2021). Developmental neurotoxicity of antimony (Sb) in the early life stages of zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *218*, 112308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112308>
- Xie, Z., Lu, G., Yan, Z., Liu, J., Wang, P., & Wang, Y. (2017). Bioaccumulation and trophic transfer of pharmaceuticals in food webs from a large freshwater lake. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.026>
- Yang, C., Lim, W., & Song, G. (2020). Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *234*, 108758. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108758>
- Yang, S., Hai, F. I., Price, W. E., McDonald, J., Khan, S. J., & Nghiem, L. D. (2016). Occurrence of trace organic contaminants in wastewater sludge and their removals by anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.080>
- Ye, M., & Chen, Y. (2020). Zebrafish as an emerging model to study gonad development. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *18*, 2373–2380. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.025>
- Ying, G. G., Zhao, J. L., Zhou, L. J., & Liu, S. (2013). Fate and occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment (surface water and sediment). In *Comprehensive Analytical Chemistry* (2nd ed., Vol. 62).

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62657-8.00014-8>

Yoon, Y., Ryu, J., Oh, J., Choi, B. G., & Snyder, S. A. (2010). Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). *Science of the Total Environment*.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.049>

Zhang, D. L., Hu, C. X., Li, D. H., & Liu, Y. D. (2013). Zebrafish locomotor capacity and brain acetylcholinesterase activity is altered by aphanizomenon flos-aquae DC-1 aphantoxins. *Aquatic Toxicology*, 138–139.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.04.016>

Zhang, L., Li, Z., Ma, G., Han, X., Li, C., Shan, M., & Chen, L. (2018). A systematic review of phenytoin intoxication induced by compound phenytoin sodium, ephedrine hydrochloride and theophylline tablets in China. *Medicine (United States)*. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013689>

Zhang, W., Zhang, M., Lin, K., Sun, W., Xiong, B., Guo, M., ... Fu, R. (2012). Ecotoxicological effect of Carbamazepine on *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.024>

Zhou, S., Chen, Q., Di Paolo, C., Shao, Y., Hollert, H., & Seiler, T. B. (2019). Behavioral profile alterations in zebrafish larvae exposed to environmentally relevant concentrations of eight priority pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.300>

Zorginstituut Nederland, 2018. GIP Database. Available at: https://www.gipdatabank.nl/databank?infotype=g&label=00-totaal&tabel=R_46_top500_atclaatst&geg=ddd&item=.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Review

A review of antiepileptic drugs: Part 1 occurrence, fate in aquatic environments and removal during different treatment technologies



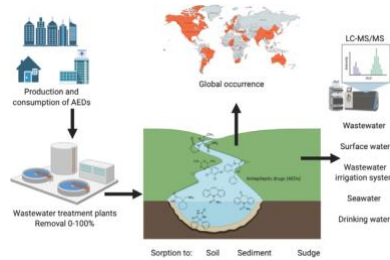
Jesús Daniel Cardoso-Vera, Gustavo Axel Elizalde-Velázquez, Hariz Islas-Flores, Alejandro Mejía-García, José Mario Ortega-Olvera, Leobardo Manuel Gómez-Oliván *

Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n, Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, Mexico

HIGHLIGHTS

- The use of antiepileptic drugs in non-epileptic disorders has steadily increased.
- Antiepileptic drugs are ubiquitously distributed in worldwide waterbodies.
- Photodegradation processes can improve the biodegradability of antiepileptic drugs.
- Little or no information is known about the antiepileptic drugs byproducts.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history: Received 23 October 2020, Received in revised form 20 January 2021, Accepted 25 January 2021, Available online 30 January 2021

Editor: Paola Verlicchi

Keywords: Antiepileptic drugs, Occurrence, Removal methods, Aquatic organisms

ABSTRACT

Antiepileptic drugs (AEDs) are the main treatment for people with epilepsy. However, in recent years, more and more people are using them for other indications such as: migraine, chronic neuropathic pain, and mood disorders. Consequently, the prescriptions and consumption of these drugs are increasing worldwide. In WWTPs, AEDs can resist degradation processes, such as photodegradation, chemical degradation and/or biodegradation. Until now, only constructed wetlands and photocatalysis have shown good removal rates of AEDs from wastewater. However, their effectiveness depends on the specific conditions used during the treatment. Since the consumption of AEDs has increased in the last decade and their degradation in WWTPs is poor, these drugs have been largely introduced into the environment through the discharge of municipal and/or hospital effluents. Once in the environment, AEDs are distributed in the water phase, as suspended particles or in the sediments, suggesting that these drugs have a high potential for groundwater contamination. In this first part of the AEDs review is designed to fill out the current knowledge gap about the occurrence, fate and removal of these drugs in the aquatic environment. This is a review that emphasizes the characteristics of AEDs as emerging contaminants.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2
2. Worldwide consumption of AEDs	2

* Corresponding author at: Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón Intersección Paseo Tollocan, Colonia Residencial Colón, CP 50120 Toluca, Estado de México, Mexico. E-mail address: imgomezo@uaemex.mx (L.M. Gómez-Oliván).



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpc

Acute exposure to environmentally relevant concentrations of phenytoin damages early development and induces oxidative stress in zebrafish embryos

Jesús Daniel Cardoso-Vera^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a,*}, Hariz Islas-Flores^a, Sandra García-Medina^b, José Manuel Orozco-Hernández^a, Gerardo Heredia-García^a, Gustavo Axel Elizalde-Velázquez^a, Marcela Galar-Martínez^b, Nely SanJuan-Reyes^a

^a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan, Colonia Residencial Colón, CP 50120 Toluca, Estado de México, Mexico

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

ARTICLE INFO

Edited by Martin Grosell

Keywords:
Antiepileptic drugs
Zebrafish
Oxidative stress
Embryotoxicity
Teratogenesis

ABSTRACT

Phenytoin (PHE) is an antiepileptic drug that has been widely used in clinical practice for about 80 years. It is mainly used in the treatment of tonic-clonic and partial seizures. The widespread consumption of this drug around the world has led to PHE being introduced into water bodies through municipal, hospital, and industrial effluent discharges. Since the toxic effects of this drug on aquatic species has been scarcely explored, the aim of this work was to investigate the influence of low (25–400 ngL⁻¹) and high (500–1500 ngL⁻¹) environmentally relevant concentrations of PHE on the development and oxidative status of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. The toxicity of PHE was evaluated from 12 to 96 h after fertilization in *D. rerio* at concentrations between 25 and 1500 ngL⁻¹. In both the control group and the 0.05% DMSO system, no malformations were observed, all embryos developed normally after 96 h. The severity and frequency of malformations increased with increasing PHE concentration compared to embryos in the control group. Malformations observed included developmental delay, hypopigmentation, miscellaneous (more than one malformation in the same embryo), modified chorda structure, tail malformation, and yolk deformation. Concerning the biomarkers of oxidative stress, an increase in the degree of lipid peroxidation, protein carbonylation, and hydroperoxide content was observed ($p < 0.05$) concerning the control. In addition, a significant increase ($p < 0.05$) in antioxidant enzymes (SOD, CAT, and GPx) was observed at low exposure concentrations (25–400 ngL⁻¹), with a decrease in enzyme activity at high concentrations (500–1500 ngL⁻¹). Our IBR analysis demonstrated that oxidative damage biomarkers got more influence at 500ngL⁻¹ of PHE. The results demonstrated that PHE may affect the embryonic development of zebrafish and that oxidative stress may be involved in the generation of this embryotoxic process.

1. Introduction

The global prevalence of epilepsy is reported at 700 per 100,000 people, affecting >70 million people worldwide (Espinosa-Jovel et al., 2018). The prophylactic use of antiepileptic drugs (AEDs) is considered the primary treatment for epilepsy (Dasgupta and Krasowski, 2020).

Unlike other drugs, AEDs are not classified by their mechanism of action. They can often be classified according to the year in which they were developed and introduced (generation). This is because drugs are

not fully elucidated in their mechanism of action and may have several modes of action (Perucca, 2005). The “first generation” AEDs (1912–1978) include carbamazepine, ethosuximide, phenobarbital, primidone, valproate, and PHE (Cotterman-Hart, 2015). PHE is a drug that has been widely used in clinical practice for about 80 years to treat tonic-clonic and partial seizures (Abou-Khalil, 2016; Patocka et al., 2020). PHE binds to the inactivated state of the Na⁺ channel and thus prolongs the neuronal refractory period, having a highly selective inhibitory effect in the motor area of the cerebral cortex. In addition,

* Corresponding author.

E-mail address: lmgomezo@uaemex.mx (L.M. Gómez-Oliván).

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109265>

Received 6 October 2021; Received in revised form 20 December 2021; Accepted 24 December 2021

Available online 3 January 2022

1532-0456/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.



Multi-biomarker approach to evaluate the neurotoxic effects of environmentally relevant concentrations of phenytoin on adult zebrafish *Danio rerio*

Jesús Daniel Cardoso-Vera ^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván ^a ✉, Hariz Islas-Flores ^a, Sandra García-Medina ^b, Gustavo Axel Elizalde-Velázquez ^a, José Manuel Orozco-Hernández ^a, Gerardo Heredia-García ^a, Karina Elisa Rosales-Pérez ^a, Marcela Galar-Martínez ^b

Show more ✓

🔗 Share 📄 Cite

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155359>

[Get rights and content](#)
