



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE
MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

“Evaluación de la toxicidad inducida por Fluconazol utilizando como
bioindicador a *Xenopus laevis*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

Maribel Ramírez castillo

DIRECTOR:

Dra. Hariz Islas Flores

ASESOR

Dr. Jesús Daniel Cardoso Vera

Toluca, Estado de México

INDICE

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Contaminación ambiental.....	12
2.1.1 Contaminación del agua	12
2.1.2 Contaminantes emergentes.....	14
2.2 Productos farmacéuticos	15
2.2.1 Antifúngicos.....	15
2.2.2 Azoles	17
2.2.3 Fluconazol.....	20
2.3 Biomarcadores	25
2.4 Teratogénesis.....	26
2.5 Bioindicadores	27
2.6 <i>Xenopus Laevis</i>	28
2.7 FETAX	30
3. ANTECEDENTES	33
3.1 Datos consumo mundial del Fluconazol.....	33
3.2 Ocurrencia de fluconazol	34
3.3 Estudios toxicológicos	36
5. HIPOTESIS.....	40
6. OBJETIVO GENERAL	40
6.1 Objetivos Específicos	40
7. METODOLOGIA.....	41
7.1 <i>Xenopus laevis</i>	41
7.1.1 Mantenimiento	41

7.1.2	Dieta.....	41
7.1.3	Aclimatación	41
7.2	Teratogénesis (Ensayo FETAX)	42
7.2.1	Reproducción.....	42
7.2.2	Selección de embriones.....	42
7.2.3	Preparación del medio FETAX.....	42
7.2.4	Preparación de las concentraciones madre y testigo	42
7.2.5	Tratamiento y siembra de embriones	43
7.2.6	Monitoreo del cultivo.....	43
7.2.7	Examinación de las larvas	43
7.3	Análisis de resultados	44
8.	RESULTADOS	45
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
10.	CONCLUSIÓN	53
11.	REFERENCIAS.....	54
12.	ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ficha técnica del fluconazol.....	21
Tabla 2. Presencia de FCZ en diversas matrices acuáticas alrededor del mundo....	34
Tabla 3. Estudios toxicológicos de FCZ en organismos acuáticos.	37
Tabla 4. Porcentaje de supervivencia, mortalidad y malformados en larvas de <i>Xenopus laevis</i> expuestos a fluconazol durante 96 h.....	45
Tabla 5. Malformaciones más representativas en larvas de <i>Xenopus laevis</i> expuestas a concentraciones de FCZ a las 96 h de exposición.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución cronológica de los antimicóticos	16
Figura 2. Mecanismo de acción de los azoles.....	19
Figura 3. <i>Xenopus laevis</i>	28
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Xenopus laevis</i>	30
Figura 5. Distribución espacial del fluconazol en masas de agua alrededor del mundo.	36
Figura 6. Tasas de mortalidad y malformaciones en larvas de <i>Xenopus laevis</i> expuestas a FCZ.....	46
Figura 7. Curva tiempo - % de respuesta de la eclosión de embriones de <i>Xenopus</i> <i>laevis</i> expuestos a FCZ.....	47
Figura 8. Frecuencia de malformaciones inducidas por la exposición de embriones de <i>Xenopus laevis</i> a diferentes concentraciones de FCZ.	48
Figura 9. Mediciones de cabeza a cola de <i>Xenopus laevis</i> expuestas a FCZ durante 96 h. (*) Diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo testigo ($p < 0.05$).....	50

ABREVIATURAS

FCZ	Fluconazol
CE	Contaminantes emergentes
CE50	Concentración efectiva media
CL50	Concentración letal media
h	Horas
CMIC	Concentración mínima para inhibir el crecimiento
IT	Índice teratogénico
OMS	Organización Mundial de la Salud
CE	Contaminantes emergentes
PFs	Productos farmacéuticos
IV	Vía intravenosa
VO	Vía oral
SNC	Sistema nervioso central
MAS	Activación metabólica exógena
DDD	Dosis diaria definida
TOC	Carbono orgánico total
hCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
IU	Unidad internacional

RESUMEN

Los casos de enfermedades causadas por hongos han aumentado en los últimos años; para tratar estas enfermedades se utilizaron fármacos antimicóticos con actividad antifúngica, provocando el crecimiento e incluso la muerte de los hongos a través de diversos mecanismos de acción. El único medicamento disponible utilizado durante casi cuatro décadas fue la anfotericina B. Sin embargo, han surgido toxicidades importantes asociadas con su uso, malos resultados en el tema de curación de los pacientes y un número cada vez mayor de pacientes en riesgo de fármacos antifúngicos (Escobar, H. F. 2022).

Fluconazol es un fármaco antifúngico perteneciente al grupo azol, donde debido a sus propiedades farmacocinéticas sobresalientes y la baja toxicidad con la que cuenta, este fármaco es una extraordinaria opción para prevenir y tratar las infecciones causadas por hongos no filamentosos. Este fármaco se llega a adquirir sin la necesidad de asistir al médico para obtener una receta, por lo tanto, es de fácil acceso, lo que conduce a que su uso sea de forma imprudente teniendo como resultado la presencia de este agente antifúngico en diversas matrices acuáticas (Escobar, H. F. 2022).

Este estudio tiene el objetivo de evaluar los cambios que se presenten en el desarrollo embrionario y los efectos tóxicos inducidos por fluconazol (FCZ) en embriones de *Xenopus laevis*, haciendo uso de la metodología establecida en la guía estándar de la American Society for Testing Materials (2019) (ASTM E 1439-12). Donde se expusieron en diferentes concentraciones ambientalmente relevantes a 24, 48, 72 y 96 horas, posterior a ello se determinó la concentración letal del 50 % (CL₅₀) dando un resultado de 2.88196 mg/L, la concentración efectiva del 50% de malformaciones (CE₅₀) de 4.17060 mg/L, el índice teratogénico (IT) calculado mediante la relación $IT = (CL_{50}) / (CE_{50})$ obteniendo un IT= 0.691, concentración mínima para inhibir el crecimiento (CMIC), así como las principales malformaciones inducidas por el FCZ. De acuerdo a los resultados obtenidos sugieren que el FCZ es más embrioletal que teratogénico en embriones de *Xenopus laevis*, lo cual es de gran importancia tener en cuenta el daño que causa al medio ambiente si no es utilizado de forma correcta.

ABSTRACT

Cases of fungal diseases have increased in recent years; antifungal drugs with antifungal activity were used to treat diseases, causing the growth and even the death of fungi through various mechanisms of action. The only available drug used for nearly four decades was amphotericin B. However, there have been significant toxicities associated with its use, poor patient cure outcomes, and an increasing number of patients at risk for antifungal drugs (Escobar, H. F. 2022).

Fluconazole is an antifungal drug belonging to the azole group, where due to its outstanding pharmacokinetic properties and low toxicity, this drug is an extraordinary option to prevent and treat infections caused by non-filamentous fungi. This drug can be acquired without the need to go to the doctor to obtain a prescription, therefore, it is easily accessible, which leads to its imprudent use resulting in the presence of this antifungal agent in various aquatic matrices (Escobar, H. F. 2022).

The objective of this study was to evaluate the changes in embryonic developmental and the toxic effects induced by fluconazole (FCZ) in *Xenopus laevis* embryos, using the methodology established in the standard guide of the American Society for Testing Materials (2019) (ASTM E 1439-12). Where they were exposed at different environmentally relevant concentrations at 24, 48, 72, and 96 hours, after which the 50% lethal concentration (LC50) was determined giving a result of 2.88196 mg/L, the effective concentration at 50% malformations (EC50) of 4.17060 mg/L, the teratogenic index (TI) calculated by the relationship $TI = (LC50) / (EC50)$ obtaining a $TI = 0.691$, minimum concentration to inhibit growth (MIC), as well as the main malformations induced by FCZ. According to the results obtained suggest that FCZ is more embryolethal than teratogenic in *Xenopus laevis* embryos, which is of great importance to take into account the damage the damage it causes to the environment if it is not used correctly.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el crecimiento poblacional ocasiona un mayor aumento en actividades humanas como la industria, la minería o la agricultura que conlleva a un gran consumo de productos, principalmente productos químicos, lo que lamentablemente conduce a mayores niveles de desechos expulsados al medio ambiente a lo que lleva a una contaminación ambiental (Deblonde et al., 2011).

Los antifúngicos son unos de los productos farmacéuticos más utilizadas debido a su amplia gama de uso, ya sea para tratar enfermedades en humanos o para controlar plagas causadas por hongos en la agricultura (Liu et al, 2018; Carvalho., 2016). Los azoles junto con la anfotericina B son considerados los fármacos antimicóticos más empleados de acuerdo con los informes de diferentes estudios, donde los azoles se dividen en dos clases que son imidazoles y triazoles (Nocua-Báez., 2020).

Entre los azoles se encuentra el fluconazol, un agente antifúngico que tiene una gran aplicación en usos médicos y veterinarios, esto permite que el compuesto arribe a las masas de agua mediante emisiones tanto hospitalarias como industriales. Donde esto es demostrado de acuerdo con los reportes encontrados acerca de su ocurrencia, por ejemplo, (Huang *et al.*, 2013) en el Rio Perla, China, se encontraron diferentes fármacos antimicóticos en las aguas residuales, donde la concentración con reporte más alto fue de FCZ con 109.6 ng/L. (Assress *et al.*, 2019) en Pretoria, Sudáfrica, recopilaron muestras de aguas residuales de una planta de tratamiento, detectando concentraciones de FCZ de 302.38 ng/L. (Kahle *et al.*, 2008) reporto niveles de concentración de 10 y 100 ng/L de FCZ en muestras de aguas residuales y superficiales de lagos en Swiss Midland., Suiza. En España se encontraron concentraciones de entre 20 y 95 ng/L en muestras de efluentes (Casado *et al.*, 2014). Siendo en Canadá donde existe el reporte con mayor concentración en aguas residuales de 3-27000 ng/L (Westlund & Yargeau., 2017). Además de los estudios de ocurrencia del FCZ, también se han realizado pruebas toxicológicas en organismos acuáticos para determinar los efectos que produce el FCZ, por ejemplo, un estudio donde se estudiaron los embriones de *Gobiocypris rarus* indicaron que se evaluaron

los efectos teratogénicos de FCZ, donde a concentración de 1 mg/L se hicieron evidentes; sin embargo no se hizo mención del tipo de malformaciones que presentaban los embriones y a 15 mg/L se presentó muerte de los organismos al 100% (Zhu et al., 2014).

Este estudio expone la hipótesis donde la exposición de embriones en etapa de blástula media de *Xenopus laevis* a diferentes concentraciones (0.09, 0.17, 0.711, 1.26 y 2.51 mg/L) de FCZ puede inducir a teratogénesis, además, de la aparición de malformaciones en larvas de *Xenopus laevis* y de la obtención de la concentración mínima para inhibir el crecimiento (CMIC) inducida por FCZ en las larvas de *Xenopus laevis* con el uso del análisis estadístico (ANOVA).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Contaminación ambiental

La contaminación ambiental se produce cuando hay existencia de agentes dañinos en un lugar en cantidades que afectan la salud, seguridad y bienestar de las personas (Anzules & Castro 2022). La contaminación ambiental también se refiere cuando elementos sólidos, líquidos o gaseosos entran en un cuerpo receptor siempre que afecten de manera negativa sus condiciones naturales, poniendo en riesgo la salud y el bienestar de las personas (Anzules & Castro 2022).

El problema ambiental en su mayoría resulta de cambios en la interacción entre la sociedad y el medio ambiente. Estas perturbaciones pueden causar contaminación en el agua, el suelo y el aire. Estos impactos ambientales afectarán a la sociedad en aspectos como la salud, el bienestar y el valor de la naturaleza (Anzules & Castro 2022).

La exposición a la contaminación por partículas finas en el aire puede causar muerte prematura y problemas de salud como ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares y empeoramiento de enfermedades respiratorias crónicas, tanto a corto como a largo plazo, asimismo, se tienen reportes de que cada año, más de 10.000 personas mueren en Argentina, Brasil y México a causa de problemas de contaminación. Por lo que de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que las ciudades mexicanas con altos niveles de PM10 en el aire son Monterrey, Ciudad de México, Guadalajara, Puebla, Juárez y León; y Monterrey y Ciudad de México carecen de datos adecuados para PM2.5 en el aire. (González et al., 2022).

2.1.1 Contaminación del agua

El agua ocupa la mayor parte del planeta (70%), en forma de océanos, lagos, ríos, aire y tierra. El agua es vital para la vida y también juega un papel importante en la regulación del clima mundial. Su importancia radica en sus propiedades singulares que lo convierten en esencial para la existencia. Es un material muy útil, que se puede

utilizar como disolvente especial y como reactivo excelente en varios procesos metabólicos. Tiene una gran capacidad para retener el calor y se expande al congelarse (Cirelli, A. F. 2012).

Casi el 97,5 % de los recursos hídricos de la Tierra están en los océanos. Solo un 2,5 % del agua disponible es dulce. La mayoría del agua dulce del planeta se encuentra en los glaciares, la nieve y el hielo de los casquetes polares, representando el 80 % del total. El agua subterránea constituye el 19 %, mientras que solo el 1% corresponde al agua superficial. El agua superficial fácilmente accesible se encuentra principalmente en lagos (52%) y humedales (38%) (Cirelli, A. F. 2012).

El agua es esencial para la vida y el desarrollo económico en cualquier región del mundo. Los recursos hídricos suelen obtenerse de fuentes de agua en la superficie o bajo la superficie terrestre (Cirelli, A. F. 2012). El uso de uno de estos recursos depende de muchos factores, empezando por la disponibilidad de cada recurso. Normalmente, el agua superficial proporciona un mayor volumen en el corto plazo, mientras que el agua subterránea se considera un recurso más estable, al menos en el mediano plazo (Cirelli, A. F. 2012).

Los productos farmacéuticos y los cosméticos son una parte fundamental en nuestra vida diaria. Estas sustancias pueden llegar a los cuerpos de agua a través de aguas residuales, las cuales pueden o no ser tratadas previamente. Donde el tratamiento de aguas residuales no logra eliminar totalmente ciertos compuestos, por lo que pueden llegar a los cuerpos de agua fácilmente. Por lo tanto, la contaminación silenciosa puede causar problemas como procesos fisiológicos anormales, reducción en la capacidad reproductiva, aumento de casos de cáncer, desarrollo de bacterias extremadamente resistentes a antibióticos y aumento de toxicidad por efectos sinérgicos (Cirelli, A. F. 2012).

La contaminación se define como la introducción de sustancias o energía en el agua que cause cambios negativos en su calidad, afectando su uso posterior o función ecológica (Blancas & Hervás, 2008).

La calidad de agua son las condiciones en que se encuentra el agua en cuanto a características físicas, químicas y biológicas, encontrándose en su estado natural o después de haber sido alteradas por la acción del hombre.

Los procesos de contaminación o degradación del recurso agua impactan negativamente en su calidad, haciendo que no sea segura para consumir, usar en la industria, la agricultura, la pesca y recreación, sino también los procesos que crean cambios en el receptor hídrico, afectándolo la cantidad o caudal disponible en un lugar y momento dado (Blancas & Hervás, 2008).

Los principales impactos del agua contaminada en el medio ambiente son: contaminación microbiana de cuerpos de agua; pérdida de ecosistemas acuáticos; riesgo de infección crónica en humanos, esto debido en parte a la contaminación química; pérdida de productividad del suelo irrigado debido a procesos de salinización, pérdida de reservas de proteínas de pescado; pérdida de suelo debido a la erosión (Cirelli, A. F. 2012).

2.1.2 Contaminantes emergentes

El término de contaminantes emergentes (CE) hace referencia a compuestos de diferente origen y naturaleza química, donde tal presencia en el medio ambiente no se considera significativa de acuerdo a distribución o concentración, siendo así que pasan de desapercibidos; sin embargo, ahora están siendo detectados y tienen la capacidad de contraer un impacto ecológico, así como efectos negativos sobre la salud. (Gil et al., 2012). Así mismo, estos contaminantes tienen la propiedad de causar daños negativos sin la necesidad de estar siempre presentes en el ambiente, ya que por su constante entrada en el ambiente se pueden compensar sus altas tasas de transformación/remoción (Gil et al., 2012).

Los CE incluyen una variedad de compuestos químicos, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, agentes tensoactivos, plastificantes y aditivos industriales, así como la síntesis de nuevos compuestos químicos o productos químicos ya existentes (Gil et al., 2012).

Estos compuestos ingresan al medio ambiente a través de diversas fuentes y vías, como aguas residuales domésticas e industriales, desechos de plantas de tratamiento de aguas residuales, aguas residuales hospitalarias, agrícolas y ganaderas. Estos contienen componentes orgánicos y contaminantes emergentes, presentes en diversas concentraciones en las aguas superficiales (Gil et al., 2012). Aún no se han establecido estándares ambientales para estos contaminantes y las plantas de tratamiento de aguas no están preparadas para eliminarlos, lo que preocupa a los reguladores científicos y medioambientales (Gil et al., 2012).

2.2 Productos farmacéuticos

Los productos farmacéuticos (PFs) forman parte de los contaminantes emergentes los cuales pueden causar efectos fisiológicos (dolor de cabeza, mareos, diarrea, dolor de estómago etc.) en los seres humanos en concentraciones muy bajas, así como efectos adversos en la vida silvestre acuática y terrestre (Checa et al., 2021).

Dependiendo de las propiedades de los fármacos, estos pueden ingresar y contaminar las aguas subterráneas, así como los acuíferos o permanecer y acumularse en el suelo afectando así a los ecosistemas y a los humanos, estos pueden ser liberados desde los lugares de fabricación y atención médica. Por lo tanto, estos productos son reconocidos como un problema ambiental emergente (Gil et al., 2012).

La mayor parte de los productos farmacéuticos que entran al sistema acuático posteriormente a su ingestión y excreción como compuestos no metabolizados o como metabolitos, se han reportado en sistemas de aguas subterráneas y potables, aguas residuales y aguas superficiales. Los PFs están constituidos por múltiples grupos de compuestos como analgésicos, antidepresivos, suplementos dietéticos, antibióticos, antiinflamatorios, antifúngicos, drogas de abuso, etc. (Checa et al., 2021).

2.2.1 Antifúngicos

El término antifúngico o antimicótico abarca a cualquier compuesto capaz de modificar las estructuras de las células fúngicas, obstaculizando así su crecimiento y afectando

de manera directa o indirecta su viabilidad y habilidad para sobrevivir. Esto a su vez, potencia las estrategias del organismo huésped (Santiago, T. A. 2014).

Los primeros registros del uso de fármacos antimicóticos en la lucha contra las micosis se encuentran datados en 1955 con la introducción de la anfotericina B, el principal desafío asociado a este medicamento es su nefrotoxicidad, lo que llevó a la búsqueda de alternativas menos agresivas para el organismo (como la anfotericina B de dispersión coloidal, la anfotericina B liposomal y el complejo lipídico de anfotericina B) y se impulsó la investigación y el desarrollo de nuevos antimicóticos (Figura 1) para la lucha contra estas enfermedades (Gregori-Valdés.,2005; Catalán & Montejo., 2006).

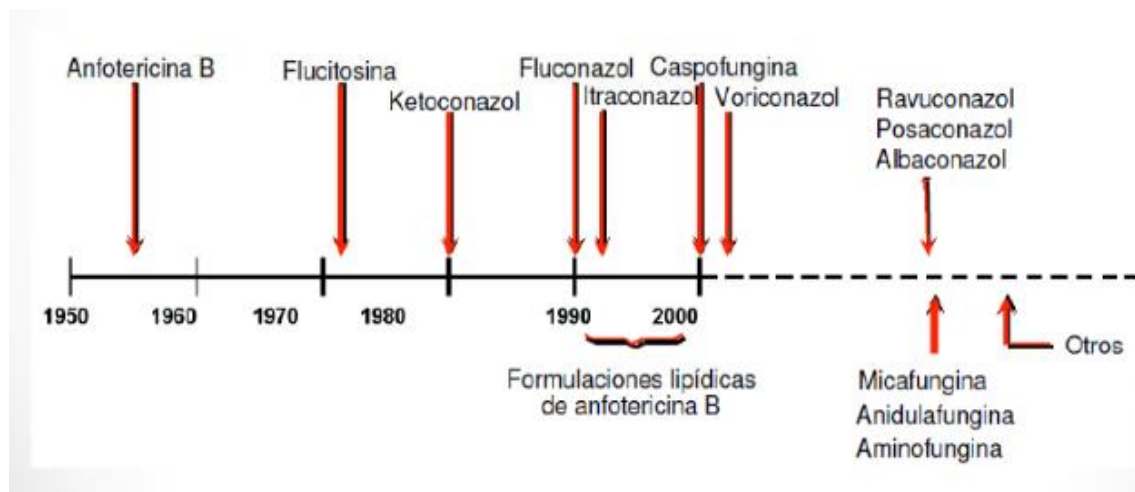


Figura 1. Evolución cronológica de los antimicóticos (Catalan & Montejo., 2006)

En la actualidad, se cuenta con una amplia diversidad de clases de fármacos antimicóticos listos para ser utilizados en la práctica clínica. Estos abarcan una gran variedad de sustancias que presentan diversas estructuras químicas y mecanismos de acción. La categorización se lleva a cabo de acuerdo a algunos criterios, como a su (Mujica, M. T. 2018):

- Estructura: polienos, azoles, alilaminas, entre otros.
- Origen: sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química.
- Espectro de acción: amplio o restringido

- Sitio de acción: membrana celular, pared fúngica, ARN.

Los antifúngicos se clasifican en las siguientes familias en función de su estructura (Mujica. M, T. 2018):

➤ **Polienos**

- Anfotericina B desoxicolato y formulaciones lipídicas Nistatina
- Natamicina

➤ **Azoles**

- Imidazoles: Ketoconazol, miconazol
- Triazoles: fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol y ravuconazol

➤ **Alilaminas**

- Terbinafina

➤ **Pirimidinas fluoradas**

- 5-fluorocitosina (5fc)

➤ **Lipopéptidos**

- Candinas: Caspofungina, anidulofungina, micafungina

➤ **Péptidos nucleósidos**

- Nikomicina Z

➤ **Derivados tetrahidrofuranos**

- Sordarinas
- Azasordarinas.

2.2.2 Azoles

Los azoles forman un grupo antifúngico heterogéneo que comparte las características de un anillo de imidazol libre unido a otros anillos aromáticos mediante enlaces carbono-nitrógeno, lo que produce cambios en las propiedades fisicoquímicas, la eficacia terapéutica y la toxicidad del fármaco. Dependiendo del número de átomos de nitrógeno en el anillo, los azoles se dividen en dos grupos. El primer grupo está compuesto por triazoles, se caracteriza por tener tres átomos de nitrógeno en su anillo

principal incluyendo fluconazol, itraconazol y voriconazol, que se distinguen de posaconazol e isavuconazol por la adición de un grupo pirimidina. Por otro lado, en el segundo tenemos a los imidazoles, una familia más sencilla con solo dos átomos de nitrógeno en la estructura del anillo, que incluye al miconazol, ketoconazol y clotrimazol (Nocua-Báez., 2020).

Los triazoles presentan una amplia actividad antifúngica y son bien soportables. Estos agentes actúan interfiriendo sobre la actividad del citocromo P450, específico de los hongos (lanosterol 14- α -desmetilasa), bloqueando así la síntesis de ergosterol en la membrana celular. La síntesis de ergosterol juega un papel crucial para mantener la integridad y permeabilidad normal de la membrana (Stockmann et al., 2014). La inhibición de la síntesis de ergosterol mediada por triazoles altera la permeabilidad de la membrana de los hongos, lo que conlleva a la muerte celular (Stockmann et al., 2014).

Los triazoles más comúnmente recetados son el fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol. En conjunto, estos medicamentos representan un avance significativo en la terapia antifúngica en niños, pero su uso se ha caracterizado históricamente por la aparición de resistencia e interacciones entre fármacos (Stockmann et al., 2014). Aunque el fluconazol es eficaz contra muchas especies de *Candida*, tiene poco o nada de efecto contra *Candida krusei*, *Candida glabrata* y la mayoría de los hongos filamentosos, incluido *Aspergillus*. Los agentes triazoles más recientes, como el posaconazol, exhiben una potente actividad in vitro contra levaduras y mohos patógenos, incluidas las cepas de *Candida* y *Zygomycetes* resistentes al fluconazol (Stockmann et al., 2014).

Las tres clases principales de agentes antifungicos utilizados clínicamente, azoles, polienos y alilamina/tiocarbamatos, deben sus actividades antifungicas a la inhibición de la síntesis o a la interacción directa con el ergosterol. Por lo que, el ergosterol es el componente predominante de la membrana celular fúngicas (Ghannoum & Rice 1999).

2.2.2.1 Mecanismo de acción de los azoles

La pared celular de los hongos le confiere su propiedad de plasticidad, es el control de la permeabilidad y la protección de las variaciones osmóticas. La integridad de esta pared depende de los esteroides que la integran, como el ergosterol, componente lipídico principal. Este lipídico esencial estimula la actividad de la quitina sintetasa, la enzima encargada del crecimiento y la división de las células fúngicas. Los azoles triazoles, actúan bloqueando la enzima 14α -esterol demetilasa, la cual depende del citocromo P-450. Esta enzima desempeña un papel crucial al ensamblar los precursores del ergosterol, llevando así a la acumulación de estas moléculas precursoras que contienen los 14α -metilados, incluyendo el lanosterol, el 4,14-dimetil-zimosterol y el 24-metilen-dihidro-lanosterol. Lo que conduce como resultado a la creación de una membrana plasmática fúngica que presenta alteraciones tanto en su estructura como en su funcionamiento, tal como se ilustra en la figura 2 (Nocua-Báez., 2020).

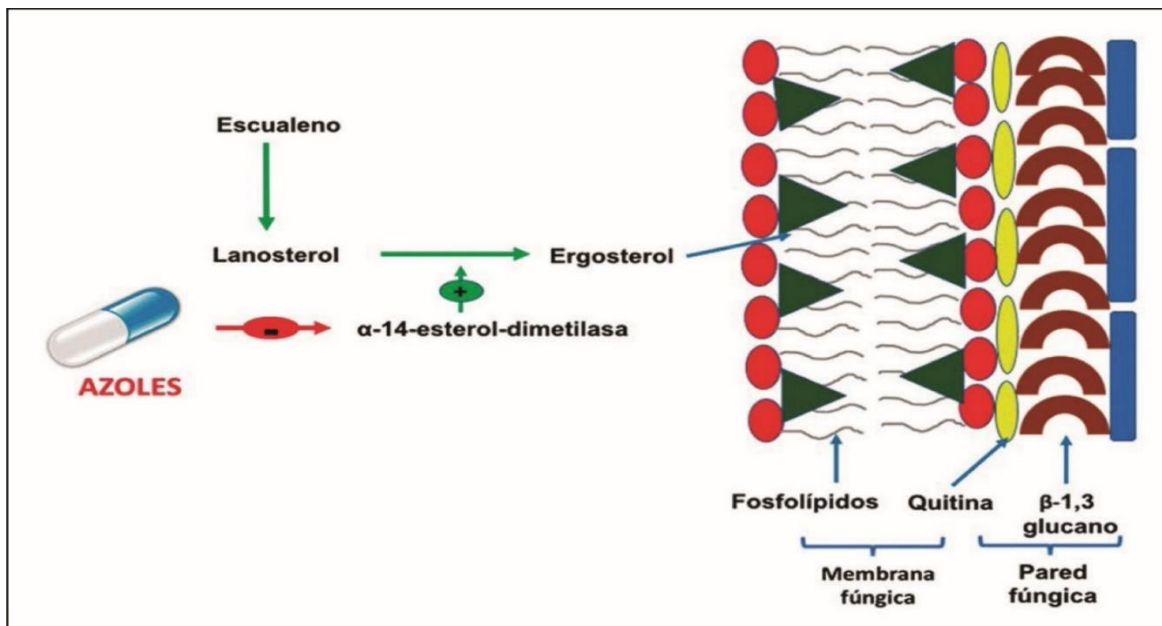


Figura 2. Mecanismo de acción de los azoles (Nocua-Báez., 2020).

Por otra parte, además de su inhibición general de la 14α -esterol-demetilasa, los azoles también se involucran activamente en el funcionamiento de otras enzimas, las cuales promueven la síntesis de compuestos como el zimosterol y el escualeno,

particularmente cuando se utiliza voriconazol, aunque estas interacciones no se identifican de manera evidente. El Fluconazol y el Itraconazol actúan interrumpiendo un proceso específico, mientras que la reducción de obtusifolion a obtusifoliol provoca la acumulación de precursores de esteroides metilados (Nocua-Báez, 2020).

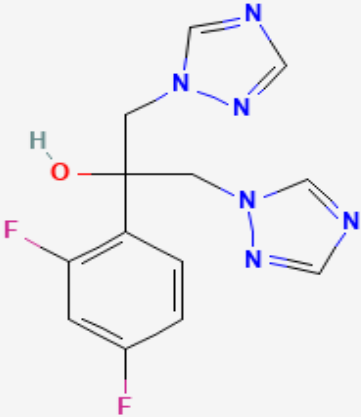
Los azoles establecen una conexión intrigante con uno de los transportadores más eficaces de la superfamilia de transportadores de casetes de unión a ATP en mamíferos: la glicoproteína P (gp-P), actuando como un freno que la inhibe. Así es como se ha descubierto que cuando la lovastatina, un inhibidor de la gp-P, se administra junto con itraconazol, sus niveles en plasma experimentan un sorprendente aumento de más de 20 veces. Esta interacción entre los azoles y la gp-P da lugar a importantes repercusiones clínicas en los sustratos de esta molécula (Nocua-Báez, 2020).

2.2.3 Fluconazol

El fluconazol es un miembro destacado de la familia de los triazoles, caracterizado por su estructura que presenta un propan-2-ol sustituido en las posiciones 1 y 3 por los grupos 1H-1,2,4-triazol-1-ilo, mientras que en la posición 2 por un grupo 2,4-difluorofenilo. Se le reconoce como un poderoso aliado en el ámbito de la medicina, ya que actúa como un antimicótico eficaz en la lucha contra la candidiasis mucosa y en diversas infecciones sistémicas. Entre sus objetivos se encuentran la candidiasis sistémica, la coccidioidomicosis y la criptococosis. Funciona como un bloqueador de la enzima P450, se considera un contaminante ambiental y también un xenobiótico. Se trata de un difluorobenceno, un fármaco antimicótico de la familia de los conazoles, un triazol eficaz y un alcohol terciario que potencia su acción. Posee una conexión funcional con un 1,3-difluorobenceno. Proviene de un hidruro de 1H-1,2,4-triazol (NCBI; PubChem., 2023).

En la tabla 1, se comparte información y/o datos del fluconazol como lo son sus propiedades fisicoquímicas, composición, farmacocinética entre otra información relevante.

Tabla 1. Ficha técnica del fluconazol (NCBI; PubChem., 2023).

CARACTERÍSTICAS	VALOR
Estructura	
Nombre IUPAC	2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-il) propan-2-ol
Formula	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O
Peso molecular	306.27 g/mol
pKa	1.76
Volumen de distribución	0.8 L/kg
Constante de disociación	2.03 a 37 °C
Biodisponibilidad	>90%
Unión a proteínas	11 a 12%
Vida media	30 hrs
Excreción renal	80 – 90 %
Solubilidad	4,363 mg/L at 25 °C (Soluble en agua)
Reino	Compuestos orgánicos
Clase	Triazoles
Subcategoría	Inhibidores del citocromo P-450 (CYP2C9)

2.2.3.1 Farmacocinética de fluconazol

El fluconazol está disponible para administración por vía intravenosa (IV) y oral (VO). En voluntarios sanos, se mide que la biodisponibilidad del fluconazol administrado por vía oral es superior al 90%, por lo que se absorbe de manera eficiente en el tracto

digestivo. Así mismo es un fármaco hidrófilo y entre el 11 y el 12 % del fármaco se une a las proteínas sérica, logra alcanzar concentraciones equivalentes en diversos fluidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo (LCR), el esputo, saliva y fluido vaginal. En adultos, se distribuye en un volumen similar al del agua corporal total (Vd de 0.8 L/kg). No obstante, en los pacientes pediátricos con un sistema inmunológico comprometido, el volumen aparente de distribución presenta variaciones según la edad. Se observa que los recién nacidos poseen el mayor volumen de distribución, el cual tiene a disminuir a medida que crecen, alcanzando finalmente los niveles propios de la adultez en la etapa de la adolescencia. De forma similar, se encuentra presente de manera extensiva en casi todos los órganos y tejidos, abarcando incluso el sistema nervioso central (SNC) (Stockmann et al., 2014; NCBI; PubChem., 2023).

El fluconazol también sufre un metabolismo mínimo y se elimina mayormente en su forma original a través de la orina, lo que significa que entre el 80 y el 90 % de su eliminación se realiza por vía renal. Se ha observado que los recién nacidos disfrutan de una vida media notablemente prolongada, la cual va disminuyendo gradualmente hasta alcanzar entre 21 y 23 horas en niños de 3 meses a 16 años de edad y aumenta nuevamente de 25 a 30 hrs entre los adultos. Estas diferencias farmacocinéticas específicas por edad sugieren que el mayor volumen de distribución en niños dará como resultado concentraciones sistémicas de fluconazol más bajas que en adultos que reciben una dosis proporcional. Además, la vida media más corta entre los niños (con excepción de los recién nacidos) tiene el potencial de resultar en una reducción de la acumulación del fármaco si los regímenes de dosificación de una vez al día en adultos se extrapolan a los niños (Stockmann et al., 2014).

2.2.3.2 Farmacodinamia de fluconazol

El fluconazol es un sofisticado agente antifúngico de origen sintético, perteneciente a la familia de los triazoles, que destaca por su actividad fungistática. Aunque su mecanismo de acción aún no se conoce con exactitud, se postula que el fluconazol actúa bloqueando la enzima esterol-14-alfa-desmetilasa, responsable de transformar el lanosterol en ergosterol, un elemento crucial de la pared celular fúngica, en

organismos susceptibles. Estos trastornos generan estructuras frágiles y extremadamente permeables que facilitan la pérdida de componentes intracelulares esenciales, como aminoácidos y potasio. Al mismo tiempo, obstaculizan la entrada de precursores vitales para la síntesis de ADN, lo que compromete el metabolismo, el desarrollo y la capacidad reproductiva de los patógenos (I.N.H, "Rafael Rangel".2022).

Se ha evidenciado que el fluconazol da a conocer su poder fungistático frente a la mayoría de las cepas de diversos microorganismos, logrando así erradicar infecciones fúngicas. Entre ellos se encuentran *Candida albicans*, *Candida glabrata* (muchas cepas son intermediasmente susceptibles), *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*. Esto se logra gracias a la inhibición de esteroides en las células de los hongos, lo que obstaculiza la síntesis y el crecimiento de la pared celular, además de afectar la adhesión entre las células. De este modo, se aborda eficazmente el tratamiento de las infecciones fúngicas y los síntomas que las acompañan. Se ha evidenciado la capacidad del fluconazol para frenar el crecimiento de hongos en diversos modelos animales, ya sean sanos o inmunocomprometidos. Esta actividad fungistática se ha observado en infecciones fúngicas que afectan tanto el sistema circulatorio como el sistema nervioso, como las provocadas por *Cryptococcus neoformans*, así como en aquellas infecciones sistémicas causadas por *Candida albicans*. Es importante destacar que se han identificado organismos que han desarrollado resistencia a varias cepas de organismos tratados con fluconazol. Esto refuerza aún más la importancia de implementar pruebas de susceptibilidad al contemplar el uso de fluconazol como opción en el tratamiento antifúngico (NCBI; PubChem., 2023).

2.2.3.3 Toxicidad de fluconazol

El fluconazol se entrelaza con la 14- α desmetilasa, una enzima del citocromo P-450, desempeña un papel crucial en la transformación del lanosterol en ergosterol. Dado que el ergosterol es un elemento clave en la estructura de la membrana celular de los hongos, bloquear su síntesis provoca una mayor permeabilidad celular, lo que lleva a la pérdida de componentes esenciales del interior celular. Este medicamento

posee la capacidad de bloquear la respiración endógena, interactuar con los fosfolípidos que componen las membranas celulares, frenar la conversión de levaduras a formas miceliales, obstaculizar la absorción de purinas y modificar la biosíntesis de triglicéridos y/o fosfolípidos (NCBI; PubChem., 2023).

En un informe de caso, se describió la toxicidad aguda del fluconazol con afectación del sistema nervioso periférico. Además, el paciente desarrolló polineuropatía, estado de confusión, lesión renal aguda y púrpura trombocitopénica trombótica. Se han documentado casos de sobredosis de fluconazol que han llevado a episodios de alucinaciones y comportamientos marcados por la paranoia. Ante una sobredosis, es crucial implementar un tratamiento que alivie los síntomas, acompañado de medidas de soporte y, si es necesario, realizar un lavado gástrico para asegurar la seguridad del paciente. Dado que el fluconazol se elimina a través de la orina, una sesión de hemodiálisis de tres horas puede reducir los niveles de este medicamento en los niveles plasmáticos en cerca de un 50% (Govindarajan et al., 2023).

2.2.3.4 Dosis

La administración de fluconazol requiere dosis múltiples, excepto en la candidiasis vaginal, donde se recomienda una dosis única de 150 mg por vía oral. Las dosis de este medicamento pueden ser desde 200 mg el primer día, seguido de 100 mg al día como en la candidiasis orofaríngea y esofágica, hasta dosis diarias de 50 a 200 mg en el tratamiento de la peritonitis *por Candida* y las infecciones del tracto urinario.

La dosis adecuada para tratar la meningitis criptocócica aguda es de 400 mg el primer día, luego se debe tomar 200 mg al día siguiente, con una duración del tratamiento inicial de 10 a 12 semanas después de que el cultivo del líquido cefalorraquídeo sea negativo (Govindarajan et al., (2023).

2.2.3.4.1 Pacientes pediátricos

Las siguientes dosis diarias en adultos (100, 200 y 400 mg) deben ser equivalentes a las siguientes dosis (3, 6 y 12 mg/kg), respectivamente, en pacientes pediátricos, pero no se recomiendan dosis superiores a 600 mg/día (Govindarajan et al., (2023).

2.3 Biomarcadores

Los biomarcadores se refieren a la respuesta biológica, física o química, así como a parámetros biológicos que proporcionen información sobre como un organismo reacciona ante la presencia de una sustancia exógena (Hernández, F. G. 2000).

Se clasifican en tres tipos de biomarcadores (Hernández, F. G. 2000):

a) De exposición

Puede ser una sustancia exógena o metabolito dentro del individuo que muestra si el cuerpo ha estado expuesto a un xenobiótico. Este análisis se hace en los líquidos del cuerpo o en el aire que exhalamos.

Los biomarcadores de exposición se clasifican en dos subgrupos:

- a. **Selectivos:** Se basa en la cuantificación precisa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos.
- b. **No selectivos:** Constituyen un grupo diverso de indicadores de exposición.

b) De susceptibilidad

Actúan como indicadores que revelan cuán sensible es una persona ante la acción de un xenobiótico o un conjunto de sustancias tóxicas. Existen dos categorías:

- a. **Marcadores de polimorfismos de sistemas activadores:** Evalúan la funcionalidad de las enzimas del citocromo P-450.
- b. **Marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores:** Son medidas de la actividad de enzimas como la glutatión-S-transferasa, la acetiltransferasa, la sulfotransferasa, la glucuroniltransferasa o la paraoxonasa.

c) De respuesta (o efecto)

Revelan las transformaciones bioquímicas que se producen en el cuerpo al entrar en contacto con sustancias exógenas. Esto abarca una serie de transformaciones, como

variaciones en la composición de las células sanguíneas, alteraciones en la actividad de las enzimas, la creación de aductos del ADN, elevaciones localizadas de ARN-m, un incremento de ciertas proteínas y, en ciertos casos, la formación de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) dirigidos hacia un xenobiótico o incluso contra fragmentos celulares como el núcleo o la membrana.

2.4 Teratogénesis

La teratogénesis hace referencia a los cambios morfológicos, bioquímicos o funcionales, de un embrión o feto debido a factores genéticos y ambientales la cual puede ser localizada a lo largo de la gestación, el nacimiento o posteriormente. Por tanto, los factores hacen énfasis a los medicamentos, drogas, sustancias químicas, así como condiciones o enfermedades maternas (Rojas et al., 2015).

Los Teratógenos Genéticos son causados por mutaciones genéticas o cromosómicas, es decir son cambios en el código genético en los portadores de defectos congénitos. Las mutaciones son errores que ocurren en la secuencia del ADN, por lo tanto, puede afectar a genes y cromosomas específicos, como éstos son los responsables de la transmisión de los caracteres de determinada especie se presentara una modificación en la expresión del fenotipo que es aleatoria, es decir favorable o desfavorable, aunque los organismos han alcanzado un nivel de adaptación y especialización después de millones de años de desarrollo, las mutaciones que se producen suelen ser perjudiciales (Rojas et al., 2015).

En el proceso de replicación del material genético este se ve afectado por factores físicos, químicos y también nutricionales. Normalmente las enzimas reparadoras ejecutan su acción corrigiendo el error, para que el cariotipo del individuo quede completamente corregido, si lléguese a fallar el mecanismo de reparación el cariotipo presentará cambios en la secuencia de su ADN por lo que en este caso se convertirán en la fuente de alteraciones del desarrollo de un embrionario, lo que conducirá a malformaciones congénitas. Se especula que agentes, biológicos químicos y físicos también pueden conducir al mismo resultado, es decir, la modificación del ácido desoxirribonucleico, ADN. Por último, algunos factores ambientales provocan el origen

de algunas de las mutaciones y por ende de desarrollos embrionarios anormales (Rojas et al., 2015).

2.5 Bioindicadores

Los bioindicadores son organismos vivos considerados de gran beneficio para ayudar a localizar cambios en los ecosistemas debido a la sobreexplotación, contaminación ambiental o cambio climático, permitiendo reconocer las fuentes de los daños para así poder mostrar posibles cursos de acción (Zuarth et al., 2014).

Los bioindicadores deben contar con las siguientes características (Díaz & Gómez, 2013):

- 1) Bien distribuido en el campo de importancia
- 2) Poseer dimensiones significativas que facilitan la realización de estudios en una variedad de tejidos y órganos
- 3) Resistir los contaminantes en niveles similares a los encontrados en el entorno sin sufrir consecuencias letales
- 4) Supervivencia en el entorno de laboratorio
- 5) Capacidad de replicarse
- 6) Sensible a la tensión xenobiótico

Los invertebrados bentónicos están recomendables para monitorear el cambio de la salud del medio ambiente en entornos acuáticos. Su carácter sedentario facilita un profundo análisis espacio-temporales de cómo las alteraciones de su entorno provocan los efectos. En los organismos bentónicos es usual distinguir cómo las variables ambientales les afectan. Gracias a su habilidad de manejo, se convierte en una herramienta recomendable para evaluar el impacto de diferentes impactos (Zuarth et al., 2014).

Los organismos bioindicadores son valiosos aliados en el monitoreo de la salud ambiental de nuestro entorno. Teniendo esta idea presente como el sostenimiento de

las variables y parámetros esenciales tales como físicos, químicos, sedimentológicos y ecológicos que sustentan la vida en nuestro planeta (Zuarth et al., 2014).

2.6 *Xenopus Laevis*

Xenopus laevis es un anfibio acuático, vive entre 15 y 20 años en condiciones de cautiverio. Se ha convertido en un aliado en la investigación de enfermedades humanas, puesto que comparte importante similitud estructural con su genoma así mismo produce una gran cantidad de huevos (alrededor de un centenar) que son fácilmente fecundados, dando como resultado infinidad de embriones en cuestión de días y en cualquier época del año. Forma parte de la clase *Amphibia*, orden *Anuran* y familia *Pipidae*; es una especie procedente de regiones como el Valle del Rift Africano y normalmente habita en entornos de aguas cálidas, estancadas, rodeadas de pastos, así como en arroyos de regiones áridas y semiáridas (Islas, F. H. 2018).

Su forma es verdaderamente singular: carece de aberturas auditivas visibles y no tiene lengua, lo que hace que utilice sus patas delanteras como herramientas para alimentarse. Su cuerpo aplanado y su cabeza pequeña, mientras que sus ojos, pequeños y sin párpados superiores. Las extremidades delanteras son cortas y sin membranas, en contraste con sus patas traseras, que son robustas y armadas con cuatro garras. Esta combinación de características es la razón por la que la conocemos como la rana de garras africana (Islas, F. H. 2018).



Figura 3. *Xenopus laevis* (Islas, F. H. 2018)

Los machos tienen un tamaño que oscila entre 7.5 y 10 cm y un peso cercano a los 60 gramos, mientras que las hembras son un poco más robustas, alcanzando longitudes de entre 10 y 12.5 cm y pesando alrededor de 200 gramos. Se nutren de animales muertos tanto como de vivos, con una preferencia marcada por los artrópodos. Además, llegan a reproducirse hasta cuatro veces de huevos en un año, poniendo huevos con un diámetro aproximado de 1.2 mm. En esta especie, la metamorfosis se lleva a cabo de manera sorprendentemente rápida, logrando alcanzar la madurez sexual en cuestión de meses. La mayor parte de su vida la pasan sumergidos en el agua, emergiendo de vez en cuando a la superficie para llenar de aire sus pulmones desarrollados (Islas, F. H. 2018).

Su ciclo de vida comprende las siguientes etapas (Islas, F. H. 2018):

- Embrionaria (etapa 1)
- Segmentación (2-6)
- Blástula (7-9)
- Gástrula (10-12)
- Néurula (13-21)
- Larval. Se divide en temprana (22-28) y tardía (29-46)
- Renacuajo, etapa subdividida en premetamorfosis (47-54), prometamorfosis (55-60) y clímax (61-65)
- Juvenil (66)
- Adulta (aproximadamente a los dos años de vida).

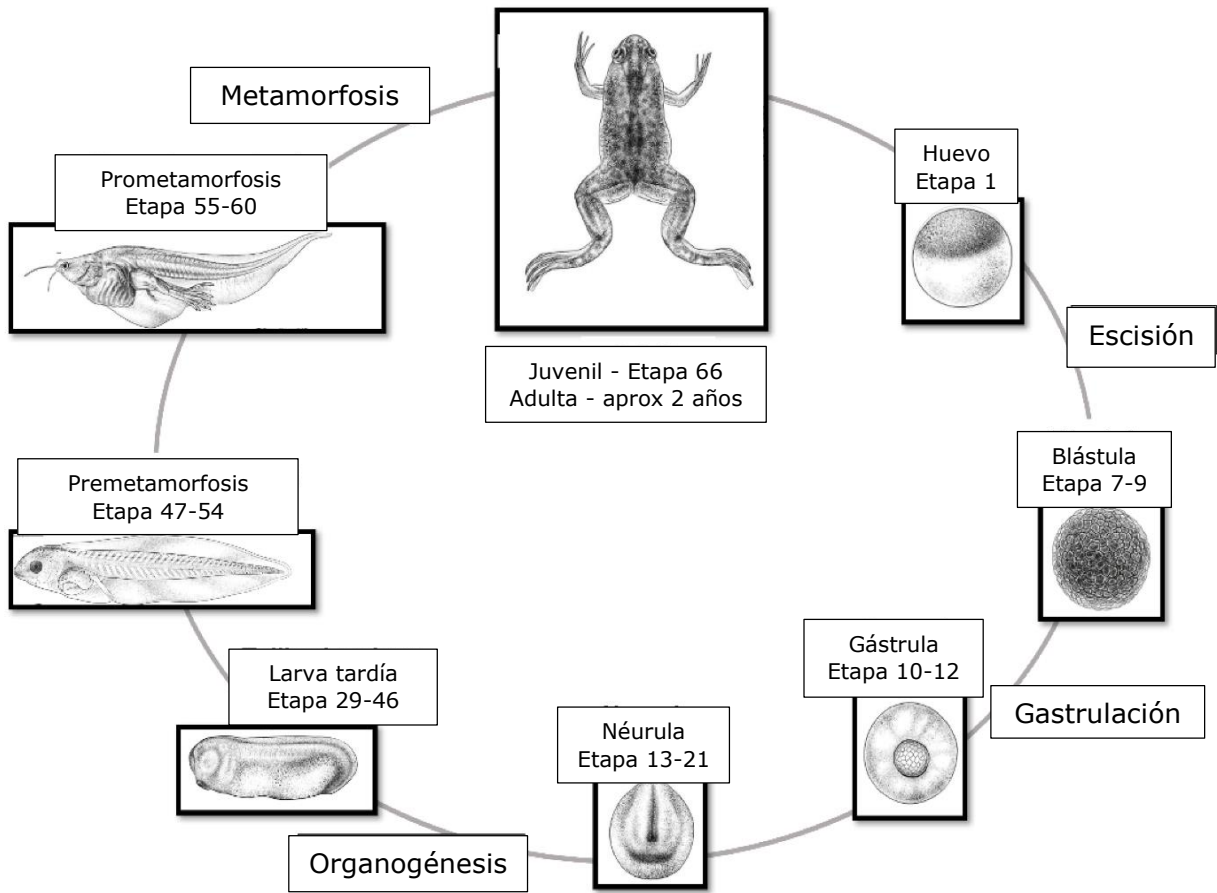


Figura 4. Ciclo de vida de *Xenopus laevis*. Modificado de Carotenuto et al., 2023.

2.7 FETAX

FETAX es una prueba útil de toxicidad aguda (96 h), empleando embriones de *Xenopus laevis*. Está diseñada para evaluar el riesgo de toxicidad embrionaria y la posibilidad de malformaciones causadas por productos químicos y combinaciones complejas de estas. Los aspectos clave para la valoración incluyen la tasa de mortalidad, la presencia de malformaciones y la inhibición del crecimiento. A partir de los registros de mortalidad y malformaciones obtenidos en un rango de niveles de dosis, se calculan la concentración letal del 50 % (CL₅₀), que representa la concentración estimada capaz de provocar la muerte en la mitad de los embriones expuestos y la concentración efectiva del 50 % para malformaciones (CE₅₀), que indica la concentración que se considera responsable de causar malformaciones en el 50 % de los embriones expuestos. Estas dos estimaciones precisas sirven como base para

determinar el índice teratogénico (IT), el cual se calcula dividiendo la CL_{50} entre la CE_{50} . El crecimiento se evalúa midiendo la longitud de la cabeza a la cola de los embriones. La Concentración Mínima para Inhibir el Crecimiento (CMIC), que representa la concentración más baja de sustancia capaz de inhibir el crecimiento, se establece mediante un análisis estadístico. Este análisis evalúa la longitud media de los embriones tratados durante 96 horas y la contrasta con la de un grupo de control. La evaluación estadística se fundamenta en la aplicación de la prueba t de Student, enfocándose en datos agrupados con un nivel de significancia establecido en $p < 0,05$. Se puede emplear cualquiera de los tres criterios: el índice teratogénico, inhibición del crecimiento o la gravedad de las malformaciones inducidas, para reconocer la presencia de un teratógeno. Los valores de IT que supere 1,5 indica un mayor potencial de malformaciones embrionarias, siempre que no exista una ausencia de mortalidad entre los embriones significativa. Se afirma que la inhibición del crecimiento está ligada a la teratogenicidad en el ensayo FETAX. Se considera que hay un riesgo teratogénico cuando el crecimiento se inhibe significativamente en concentraciones por debajo del 30 % de la LC_{50} a las 96 horas, lo que implica que la relación entre la concentración mínima inhibitoria crítica (CMIC) y la CL_{50} debe ser inferior a 0,30. Los teratógenos, en concentraciones que rondan la CL_{50} de 96 horas, suelen provocar malformaciones que van desde ligeras hasta severas (NICEATM. 2000).

FETAX se presenta como una esencial prueba de la organogénesis, la cual se ha mantenido conservada en anfibios y mamíferos. Las primeras 96 horas del desarrollo embrionario en *Xenopus laevis* reflejan una intrigante similitud con varios de los principales procesos de la organogénesis en humanos. Así, FETAX podría convertirse en una valiosa herramienta para anticipar la presencia de sustancias tóxicas y teratógenos en el desarrollo humano. Considerando la particularidad de los criterios de valoración evaluados, FETAX opta por no proporcionar información sobre sustancias que podrían provocar déficits en el desarrollo funcional de los mamíferos. Dado que los embriones de *Xenopus laevis* carecen de la capacidad en los procesos de activación metabólica que dependen de la oxidasa de función mixta, incorporar un sistema de activación metabólica exógena (MAS) en el ensayo facilita la evaluación de

la toxicidad para el desarrollo con la sustancia original además de los metabolitos (NICEATM. 2000).

Por lo tanto, FETAX ofrece una potente herramienta con el fin de analizar la toxicidad de sustancias químicas en el desarrollo de embriones de anfibios, brindando valiosa información sobre la teratogenicidad y el potencial de malformaciones. Sin embargo, su aplicación va más allá de los anfibios, ya que su relevancia se entiende a la predicción de posibles efectos tóxicos en el desarrollo humano. La inclusión de un sistema de activación metabólica exógena completa su utilidad al permitir la evolución de la toxicidad de los metabolitos. Este enfoque innovador tiene el potencial de impulsar avances significativos en la valoración de la seguridad de los productos químicos, tanto para la vida silvestre como para la salud humana.

3. ANTECEDENTES

3.1 Datos consumo mundial del Fluconazol

El uso de antifúngicos en los 65 países estudiados de ingresos medios y altos aumentó durante el período del estudio, de 0,5 dosis diarias definidas/1.000 personas/día (DDD) en 2008 a 0,92 DDD en 2018, con una tasa de crecimiento anual promedio del 6,2 %. El uso de antifúngicos disminuyó recientemente en los países de ingresos altos, mientras que el consumo en los países de ingresos medios (y especialmente en los de ingresos medianos bajos) continúa aumentando. El uso de triazol aumentó rápidamente en los países de ingresos medios desde 2014, y el uso de imidazol disminuyó en los países de ingresos altos y medianos (Pathadka et al., 2022).

En 2018, los países con mayores ventas de antifúngicos fueron Bélgica (3,37 DDD), Portugal, Finlandia, Corea del Sur y Francia. Los países con el menor uso de antifúngicos fueron Filipinas (0,03 DDD), Bosnia y Herzegovina, Jordania, China y Venezuela. Así mismo, los antifúngicos más comunes vendidos en 2018 fueron itraconazol (0,32 DDD), terbinafina (0,30 DDD) y fluconazol (0,23 DDD). Los antifúngicos con menor número de ventas incluyeron polienos y equinocandinas, posiblemente debido a que solo están disponibles por vía parenteral (Pathadka et al., 2022).

El uso de itraconazol se disparó en los países de ingresos medios después de que el antimicótico se agregara a la Lista de Medicamentos Fundamentales de la OMS en 2017. El aumento del consumo de itraconazol también puede deberse a su actividad contra las especies de *Aspergillus* y su uso como solución para el aumento de la resistencia al fluconazol en la candidemia invasiva. Sin embargo, el acceso al itraconazol está plagado de problemas de disponibilidad, ya que el antifúngico no ha sido autorizado para su uso en 72 países. A pesar de las crecientes tasas de resistencia, el fluconazol sigue estando ampliamente disponible, es económico y adecuado para tratar muchas infecciones fúngicas superficiales (Pathadka et al., 2022).

3.2 Ocurrencia de fluconazol

Es de gran importancia determinar el rumbo y la cantidad de productos farmacéuticos cuando ingresan al medio ambiente ya que así se pueden tomar acciones y conocer los riesgos que estos representan.

Así mismo, como se mencionó anteriormente, el FCZ puede administrarse por vía oral e intravenosa y por sus propiedades fisicoquímicas, el compuesto tenga como vía de salida por medio de excreciones a través de la orina y la excreción fecal, llegando así a matrices acuáticas mediante los desechos domésticos o hospitalarios (Stockmann et al., 2014).

Recientemente, el FCZ y otros antifúngicos han recibido atención como contaminantes emergentes porque pueden infiltrarse en el ambiente receptor a través descargas directas o indirectas de aguas residuales. Esta situación plantea riesgos potenciales para organismos no relacionados y para la flora del entorno. Por otro lado, el incremento en la utilización de azoles ha propiciado el surgimiento de cepas de hongos que muestran una menor vulnerabilidad y una mayor resistencia a los fármacos. La precisa identificación de azoles en diversas matrices ambientales es crucial, ya que surgen inquietudes sobre los posibles peligros que estos compuestos pueden representar tanto para la salud humana como para los organismos no objetivo (Assress H. A et al., 2019).

Estudios recientes han hallado la presencia del fluconazol en distintas matrices acuáticas alrededor del mundo donde se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Presencia de FCZ en diversas matrices acuáticas alrededor del mundo.

País	Matriz	Concentración (ng/L)	Referencia
	Superficie del agua	98.7	(De Barros et al., 2018)

Brasil	Aguas residuales	63 – 1292	(Reis et al., 2019)
	Agua potable	35 – 2100	(Santos et al., 2020)
Canadá	Aguas residuales	3-27000	(Westlund & Yargeau., 2017)
China	Aguas residuales	109.6	(Huang et al., 2013)
Suiza	Aguas residuales	10 y 100	(Kahle et al., 2008)
España	Aguas residuales	20 - 95	(Casado et al., 2014)
Sudáfrica	Aguas residuales	302.38	(Assress et al., 2019)
	Aguas residuales	331 - 9959	(Assress et al., 2020)

La distribución espacial del FCZ se muestra en la figura 5. Como se puede observar este fármaco está ampliamente distribuido en cuatro de los seis continentes del planeta. De acuerdo con la información encontrada el país con mayor concentración encontrada ha sido en Canadá con hasta 27000 ng/L en aguas residuales (Westlund & Yargeau., 2017).

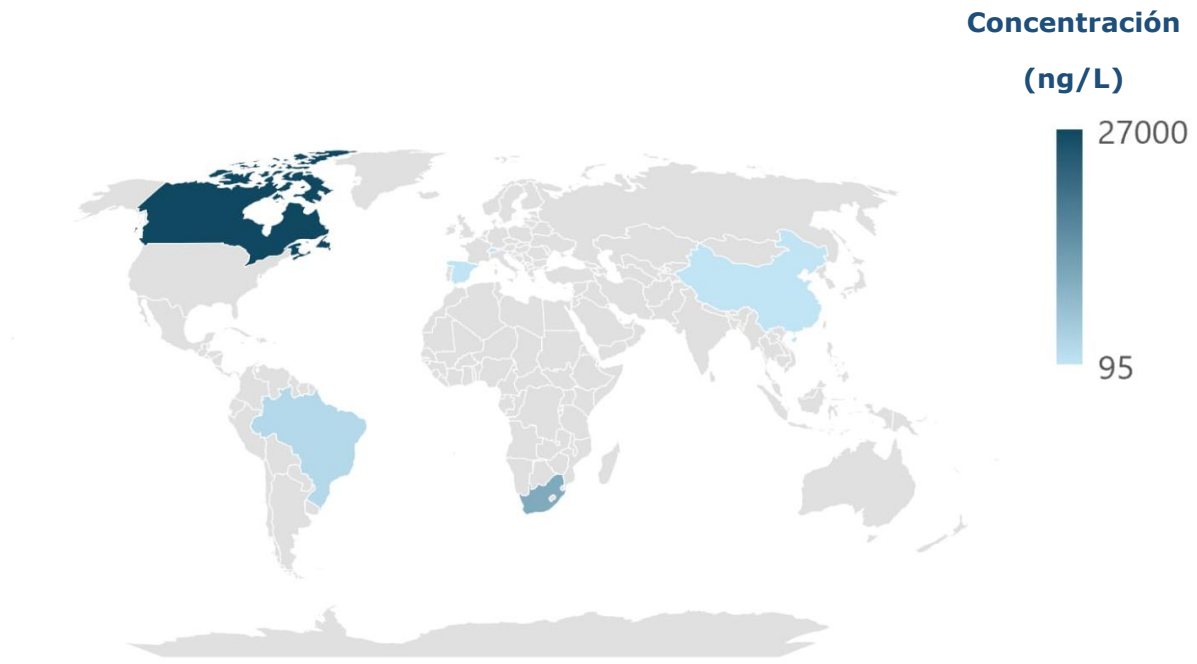


Figura 5. Distribución espacial del fluconazol en masas de agua alrededor del mundo.

3.3 Estudios toxicológicos

Es vital conocer los diversos impactos de los fármacos ya que así se tiene un mejor control y regulación sobre su seguridad con el fin de comprender la magnitud del daño que puede infligir en el medio ambiente.

De igual forma como hay estudios de ocurrencia también se encuentran investigaciones donde se estudian los riesgos tóxicos en diversas especies como se observan en la tabla 3. Los cuales han mostrado que el fluconazol puede afectar las funciones biológicas de los organismos acuáticos a diferentes niveles.

De acuerdo con todas las investigaciones consultadas se aprecian las pruebas de que existen los riesgos que ocasiona el FCZ al tener contacto con el medio ambiente en especial en los organismos acuáticos los cuales llegan a presentar grandes alteraciones en sus funciones biológicas llegando hasta la muerte de acuerdo a las concentraciones expuestas.

Tabla 3. Estudios toxicológicos de FCZ en organismos acuáticos.

Clase	Especie	Concentración de exposición	Riesgos potenciales	Referencia
Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	2,766.423 ng/L 183.493 ng/L	Inmovilización	Chen & Ying; 2015)
	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	> 100 (mg/L).	Toxicidad aguda	(Kim et al., 2009)
Peces	<i>Oryzias latipes</i>	> 100 (mg/L).	Toxicidad aguda	(Kim et al., 2009)
	<i>Gobiocypris rarus</i>	15 mg/L 1 mg/L	General el 100 % de muerte en organismos. A 1 mg/L se hacen evidentes las malformaciones.	(Zhu et al., 2014)
	<i>Danio rerio</i>	1. 800-1000 ng/L 2. 825, 875 y 925 ng/L	1. Incidencia de edema pericárdico, deformación del saco vitelino, escoliosis y de la cola. 2. Hipopigmentación, retraso en el desarrollo y en	(Escobar, H. F. 2022)

			el proceso de eclosión de los embriones	
	<i>Danio rerio</i>	3000 ng/L	Degradación de la vesícula germinal	(Katti et al., 2020).
	<i>Labeo rohita</i>	100, 200, 300 ng/L	Disminución en el conteo de células sanguíneas	(Saha et al; 2017)
Algas verdes	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	15,3 y 19,6 mg/L	Nivel de concentración sin efecto observado y el nivel de concentración con efecto más bajo observado necesario para reducir el crecimiento.	(Palomaki, A. C. 2010)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Más del 70% de los cuerpos de agua en México se encuentran afectados por diversas formas de contaminación, según el Primer Informe de Contraloría Social de la CONAGUA, publicado en 2017. Entre los elementos nocivos que contaminan nuestras aguas, se destacan los fármacos antimicóticos, que representan una preocupante amenaza para la salud de nuestros ecosistemas (Escobar, H. F. 2022).

El fluconazol es uno de los fármacos antimicóticos más utilizado debido a su seguridad y eficacia para tratar las infecciones micóticas. Además, su movilidad acuosa relativamente alta da como resultado concentraciones más altas en aguas ambientales, donde otros fármacos azólicos, tienden a adsorberse a superficies sólidas debido a su naturaleza hidrofóbica. Las evaluaciones de riesgos ambientales de los residuos de medicamentos farmacéuticos han demostrado que ciertos medicamentos azoles como climbazol, clotrimazol y fluconazol cuentan con una capacidad de mutagenicidad para el sistema endocrino de los peces y, por lo tanto, pueden ser perjudiciales para la vida acuática (Escobar, H. F. 2022). De tal forma, los agentes antifúngicos en las aguas residuales y ambientales son una clase emergente importante de contaminantes ambientales.

Por lo que, es de importancia estudiar la aparición y distribución de FCZ en la matriz de agua, para así lograr resaltar el impacto que ocasiona y poder proporcionar una variedad de estrategias o procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales que mejor correspondan.

5. HIPOTESIS

La exposición de embriones de *Xenopus laevis* en etapa de blástula media a diferentes concentraciones de fluconazol (FCZ) inducirá teratogénesis.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad inducida por fluconazol en embriones de *Xenopus laevis* utilizando el ensayo FETAX.

6.1 Objetivos Específicos

- a) Determinar la concentración letal 50 % (CL₅₀), concentración efectiva 50 % de malformaciones (CE₅₀) e índice teratogénico (IT) inducidos por fluconazol en larvas de *Xenopus laevis*.
- b) Identificar las malformaciones generales inducidas por fluconazol en larvas de *Xenopus laevis*.
- c) Determinar la concentración mínima para inhibir el crecimiento (CMIC) inducida por fluconazol en larvas de *Xenopus laevis*.

7. METODOLOGIA

Es un estudio de tipo experimental cuantitativo, en el que se estudió el mecanismo de toxicidad inducido por el fluconazol tomando como bioindicador a *Xenopus laevis*, sometiendo una muestra aleatoria simple de organismos al FCZ durante un periodo de 96 horas, realizando el estudio por duplicado para obtención de datos estadísticamente significativos.

7.1 *Xenopus laevis*

Los organismos se consiguieron del acuario de la Facultad de Química, UAEMEX. Los criterios tomados en cuenta para seleccionar los organismos aptos para su reproducción fueron los siguientes: machos de *Xenopus laevis* de 7.5 a 10 cm de longitud de al menos 2 años y las hembras de 10 a 12.5 cm de longitud que cuenten con al menos 3 años. Las hembras se caracterizan por tener un mayor tamaño que los machos y tienen labios cloacales carnosos, ayudando así con su identificación.

7.1.1 Mantenimiento

Los organismos se mantuvieron en un cuarto aislado de fuentes de luz, teniendo fotoperiodos de 12 h luz/ 12 h oscuridad. Machos y hembras fueron separados y se mantuvieron en peceras de 60 L y 30 cm de altura, manteniendo las paredes opacas. La temperatura del agua se mantuvo en $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Se realizó la limpieza de peceras tres veces por semana.

7.1.2 Dieta

Se alimentaron tres veces por semana con alimento comercial Spirulina Boost.

7.1.3 Aclimatación

Para la aclimatación y mantenimientos de los organismos se utilizó agua natural. Se determinando los siguientes parámetros una vez al mes: pH (entre 6.5 y 9), carbono orgánico total (COT) (inferior a 10 mg/L), alcalinidad y dureza mediante la determinación de CaCO_3 (entre 16 y 400 mg/L).

7.2 Teratogénesis (Ensayo FETAX)

El estudio se realizó de acuerdo con los procedimientos abordados en la guía estándar de la American Society for Testing Materials (2019) (ASTM E 1439-12).

7.2.1 Reproducción

Se colocó una pareja de hembra y macho en una pecera de 40 L, los lados se mantuvieron opacos, la temperatura del agua se mantuvo a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, al igual que el fotoperiodo de 12 h luz/ 12 h oscuridad. Para la inducción, la noche anterior al ensayo se les aplicó una inyección subcutánea de 700 IU de hormona gonadotropina crónica humana (hCG, disuelta en solución 0.9% de NaCl estéril) a las hembras y 300 IU a los machos en el saco linfático dorsal, haciendo uso de jeringas de 1 mL equipadas con agujas largas de calibre 26.

7.2.2 Selección de embriones

A la mañana siguiente se revisó la deposición de ovocitos por parte de la hembra, afirmando esto se extrajeron de la pecera y se colocaron en un recipiente separado, posteriormente se limpiaron para así poder ser inspeccionados. Se observaron utilizando un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 305), seleccionando solamente aquellos embriones que se encontraban en etapa de blástula media (etapa 7- 9).

7.2.3 Preparación del medio FETAX

El medio FETAX se preparó disolviendo 625 mg de NaCl, 96 mg NaHCO_3 , 30 mg KCl, 15 mg CaCl_2 , 60 mg $\text{CaSO}_4 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$ y 75 mg MgSO_4 por litro de agua destilada.

7.2.4 Preparación de las concentraciones madre y testigo

Para los grupos expuestos se utilizaron cinco concentraciones (0.09, 0.17, 0.711, 1.26, 2.51 mg/L) de FCZ y se diluyeron en medio FETAX, el grupo testigo estuvo expuesto a medio FETAX únicamente. Posteriormente se almacenó la solución madre en botellas de plástico, previamente lavadas y etiquetadas, el volumen mínimo de cada concentración final fue de 250 mL.

7.2.5 Tratamiento y siembra de embriones

Se colocaron 10 mL de cada concentración a evaluar de Fluconazol en cajas Petri de 50 mm previamente identificadas. Adicionalmente se destinó una caja con 10 mL de medio FETAX solamente como grupo control. Con el uso de pinzas delgadas se tomaron los embriones que presentaron forma regular esférica y una división celular homogénea donde cada uno se observó con el estereoscópico (Zeiss Stemi 305). Posteriormente, se colocaron 25 embriones en cada caja Petri que contenía las diferentes concentraciones para los grupos expuestos o testigo. Se mantuvieron los embriones expuestos en una incubadora a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 96 h, cada concentración se realizó por duplicado.

7.2.6 Monitoreo del cultivo

El medio FETAX de las cajas Petri de los grupos expuestos y testigo, se cambió diariamente reemplazándolo nuevamente de acuerdo con cada concentración correspondiente. A las 24 h se eliminó todo embrión que no se desarrolló dejando solo a las larvas vivas. A las 48 y 72 h de igual forma se continuó el procedimiento de limpiar el medio quitando las larvas que se fueron muriendo y solo dejando las vivas, esto se realizó con ayuda de una pipeta Pasteur de 2 mL. Llevando así un informe diario con observaciones y registro de larvas muertas.

7.2.7 Examinación de las larvas

A las 96 h se comprobó que las larvas nadaran, de no ser así se pudo percatar cuales eran las que ya presentarían alguna malformación, las larvas muertas se removieron de las cajas Petri, obteniendo así ya el número de larvas muertas de acuerdo a cada concentración. Una vez realizado el registro de datos se derivó a la eutanasia de las larvas vivas, para lo cual se colocó una solución de formol al 10% en unos frascos de plástico redondos pequeños. Posteriormente se midieron todas las larvas desde la cabeza hasta la cola utilizando el software ZEN Blue de Zeiss, y se reportó el valor en la hoja de parámetros de desarrollo. Se examinó cada larva en el microscópico para identificar malformaciones de desarrollo, apoyándose en el atlas de anomalías de Bantle (Bantle et al., 1991).

Después de haber obtenido todos los datos necesarios de las larvas de cada concentración, se eliminaron las larvas de acuerdo con las normas internas relativas a muestras biológicas.

7.3 Análisis de resultados

Una vez de haber completado la prueba correspondiente al ensayo FETAX, se continuó con el cálculo de los parámetros y análisis estadístico de los datos. Para la determinación de la concentración letal media (CL_{50}) y la concentración efectiva media de malformación (CE_{50}) se realizó un análisis probit. El índice teratogénico (IT) se determinó mediante la siguiente relación: $IT = (CL_{50}) / (CE_{50})$. Posteriormente para la determinación de la concentración mínima que inhibe el crecimiento (CMIC) se compararon las mediciones de todas las larvas desde la cabeza a la cola usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) haciendo uso de la prueba FISHER y los valores se consideraron significativos a una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

En la tabla 4 se encuentran los datos correspondientes con el ensayo FETAX, donde se expusieron las cinco diferentes concentraciones de FCZ (0.09, 0.17, 0.711, 1.26, 2.51 mg/L). Se puede observar que se obtuvo un porcentaje (%) mayor de mortalidad en la concentración de 2.51 mg/L y un porcentaje (%) de 100 a partir de la concentración 0.711 mg/L.

La concentración letal media (CL₅₀) calculada fue de 2.88196 mg/L (IC 95%: 2.412 a 3.352 mg/L), así mismo, la concentración efectiva media de malformaciones (CE₅₀) fue de 4.17060 mg/L (IC 95%: 5.257 a 3.084 mg/L).

Tabla 4. Porcentaje de supervivencia, mortalidad y malformados en larvas de *Xenopus laevis* expuestos a fluconazol durante 96 h.

Concentración de FCZ () mg/L	% de supervivencia	% Mortalidad	% Malformados
0 (Control)	100	0	0
0.09	90	10	73.33
0.17	84	16	95.24
0.711	70	30	100
1.26	65.33	34.67	100
2.51	60	40	100
	(CL ₅₀): 2.88196 IC (2.412-3.352)	(CE ₅₀): 4.17060 IC (5.257-3.084)	
	IT: 0.691		
	IC: Intervalo de confianza	IT: Índice teratogénico	

El índice teratogénico se determinó mediante el uso de la relación entre la concentración letal media (CL₅₀) y la concentración efectiva media de malformaciones (CE₅₀):

$$IT = \frac{CL50}{CE50}$$

No se observaron malformaciones por parte del control, ya que todos los embriones presentaron un desarrollo normal al término de las 96 horas, por otra parte, en las larvas expuestas a las diferentes concentraciones de FCZ se observó que tanto la frecuencia como el nivel de malformaciones fueron en aumento de acuerdo con el incremento de dichas concentraciones de FCZ, pero a partir de la tercera concentración se llegó a un 100 % de malformados como se puede observar en la Figura 6.

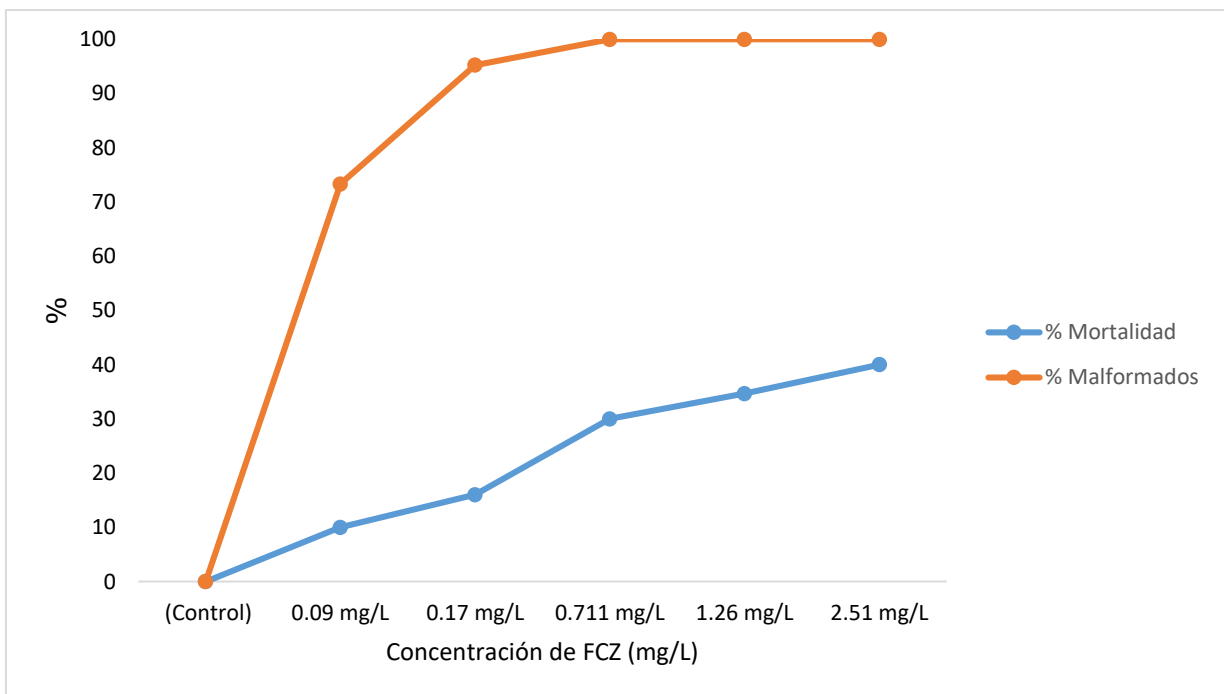


Figura 6. Tasas de mortalidad y malformaciones en larvas de *Xenopus laevis* expuestas a FCZ.

La tasa de eclosión de las larvas disminuyó significativamente en un patrón dependiente de la concentración en comparación con el grupo control. La tasa de mortalidad de las larvas de *Xenopus laevis* aumentó significativamente cuando se expusieron a 0.711, 1.26 y 2.51 mg/L de FCZ a las 96 h como se presenta en la figura 7. Esto indujo a distintas anomalías morfológicas durante el desarrollo embrionario, incluyendo retraso en el desarrollo, malformación de cola, ano, aleta, cabeza,

notocorda, facial o fracaso total de desarrollo, intestino, así como enrollamiento anormal del intestino, hipopigmentación ocular, edema óptico, facial, abdominal, óptico, cardiaco, craneofacial y malformación severa. Por lo tanto, se notó un incremento notable en las tasas de malformación dependiente de la concentración teniendo la concentración más alta el valor máximo a las 96 horas.

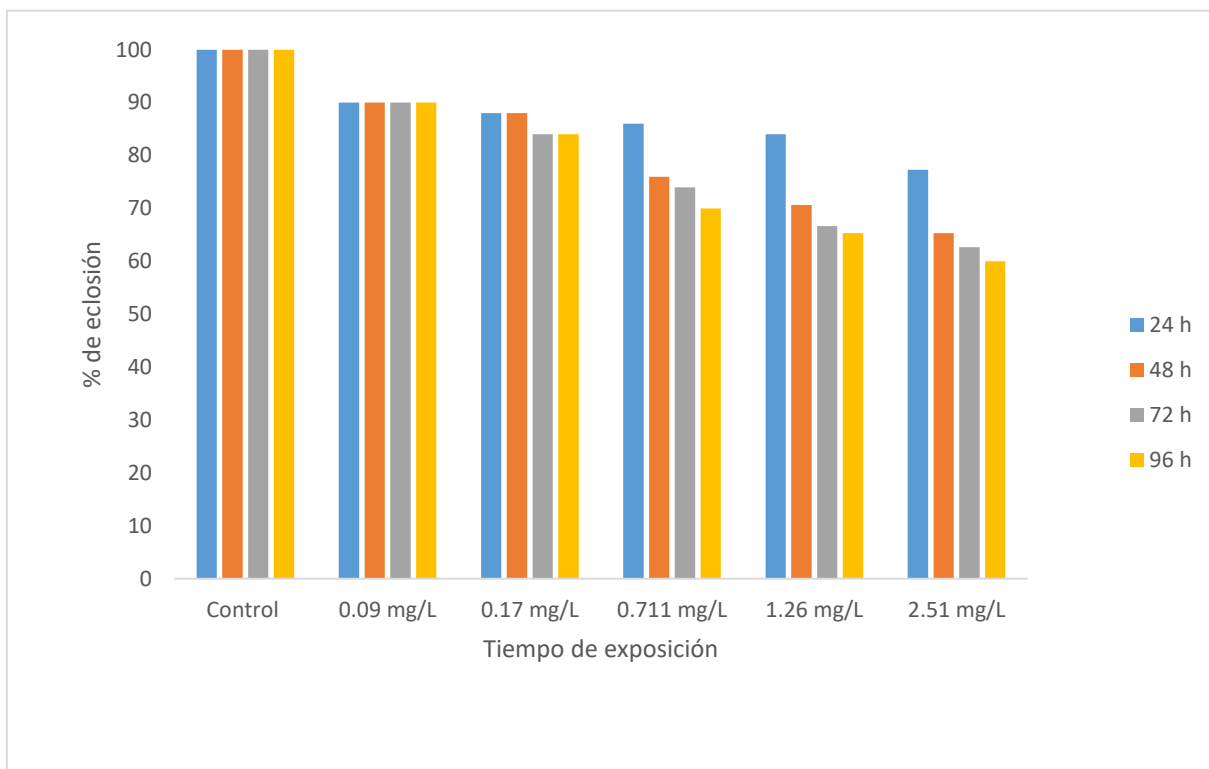


Figura 7. Curva tiempo - % de respuesta de la eclosión de embriones de *Xenopus laevis* expuestos a FCZ.

Como se presenta en la figura 8, las larvas de *Xenopus laevis* expuestas a FCZ mostraron un notable incremento en la prevalencia de malformaciones cuando se comparan con el grupo control. No obstante, la prevalencia de malformaciones en las larvas no evidenció una tendencia dependiente de la concentración. Algunas de las malformaciones que se presentaron con más frecuencia fueron: la malformación de ano, cola, notocorda, aleta y ojo, así como enrollamiento anormal del intestino y edema cardiaco.

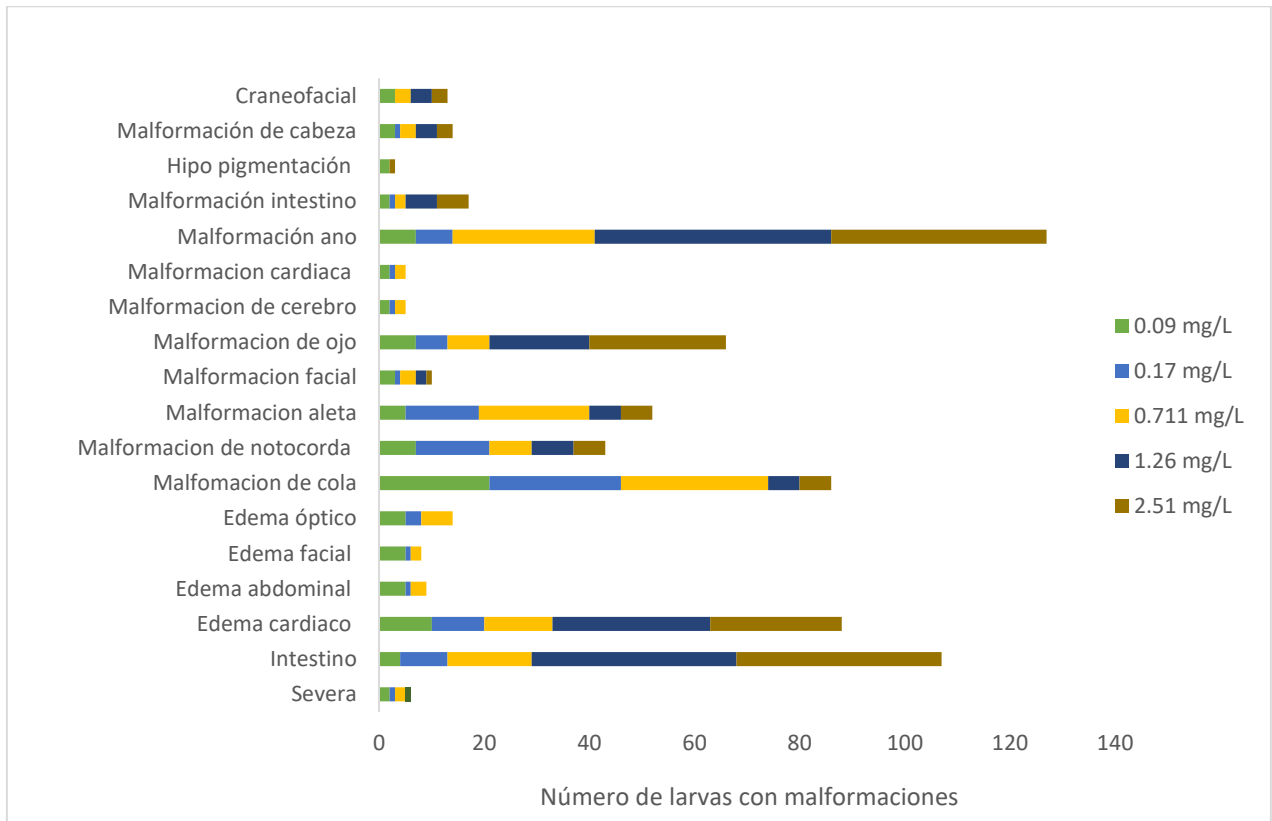

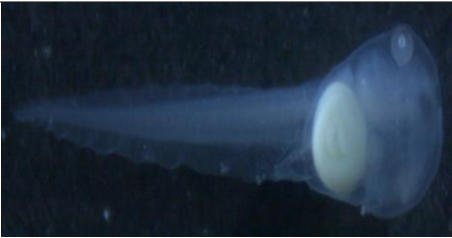






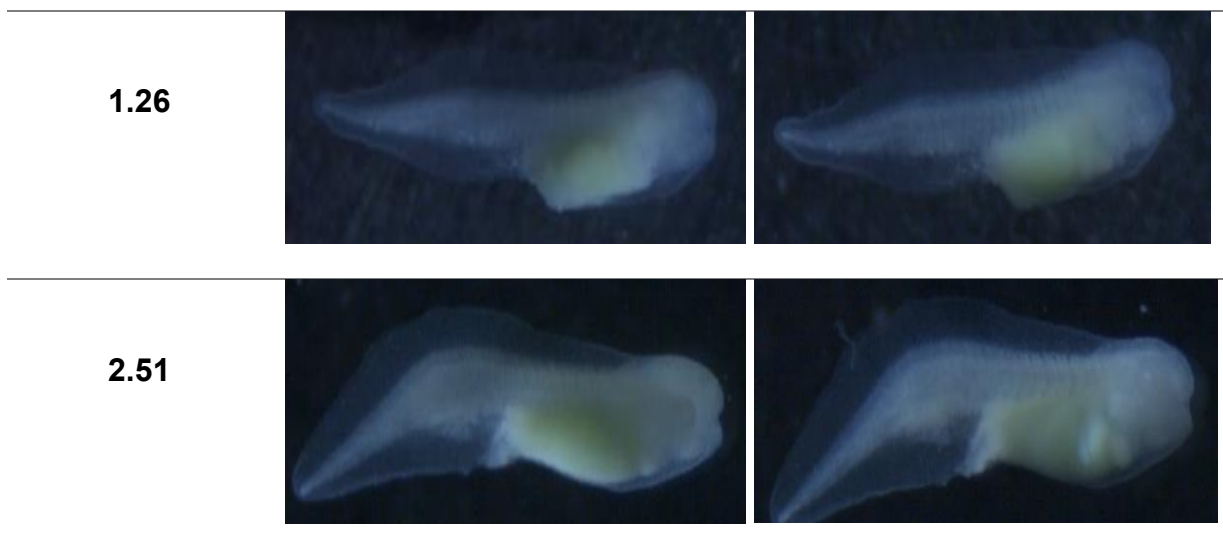


Figura 8. Frecuencia de malformaciones inducidas por la exposición de embriones de *Xenopus laevis* a diferentes concentraciones de FCZ.

La tabla 5 representa imágenes de larvas de *Xenopus laevis* expuestas a FCZ después de 96 horas, donde el grupo de control mostro un desarrollo normal. Se presentan imágenes microscópicas con gran exactitud de malformaciones severas representativas en larvas expuestas a cinco diferentes concentraciones, en las cuales se puede observar cómo inhibición del crecimiento, malformaciones de la notocorda, ópticas, intestinal, cardíaca, ano, cola, facial y cabeza, craneofacial, edema grave abdominal, cardíaco y facial, así como donde el tubo neural fallo durante la neurulación por lo que no hubo desarrollo de cerebro y los demás órganos están malformados, lo cual es considerado severa. En las dos últimas concentraciones (1.26 y 2.51 mg/L) hubo retraso de desarrollo por lo que ya no fueron tan evidentes las malformaciones.

Tabla 5. Malformaciones más representativas en larvas de *Xenopus laevis* expuestas a concentraciones de FCZ a las 96 h de exposición, observadas con el microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 305).

Concentración de FCZ (mg/L)	96 horas	
Control		
0.09		
0.17		
0.711		



Las medidas de la longitud de cabeza a la cola de los organismos se muestran gráficamente en la figura 9. Después de 96 horas de exposición, se encontró una diferencia de tamaño significativa con respecto al grupo control para las larvas expuestas a 1.26 y 2.51 mg/L de FCZ. La concentración Mínima de FCZ para Inhibir el Crecimiento (CMIC) de las larvas de *Xenopus laevis* fue de 1.26 mg/L de acuerdo con el análisis estadístico (ANOVA, Fisher LSD $p < 0.05$).

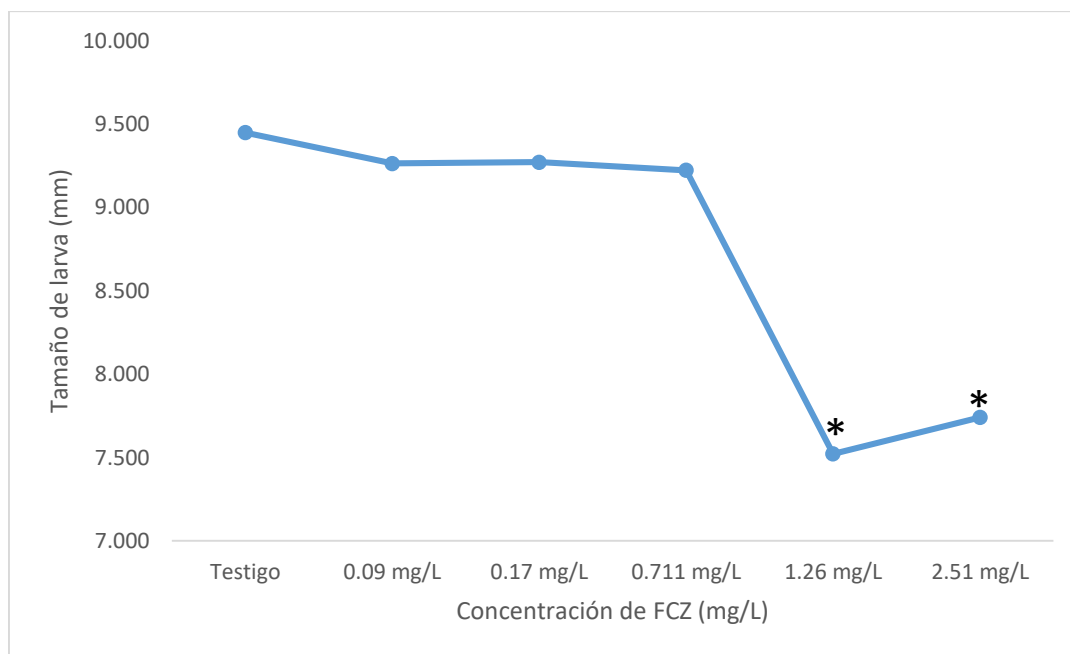


Figura 9. Mediciones de cabeza a cola de *Xenopus laevis* expuestas a FCZ durante 96 h. (*) Diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo testigo ($p < 0.05$).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente son pocos los estudios que hay sobre la toxicidad del FCZ, así como de su presencia en la matriz acuosa, y algunos de esos reportes han informado concentraciones de hasta 27000 ng/L en aguas residuales 109,6 ng/L en aguas superficiales y 2100 ng/L en agua potable (Escobar et al., 2022) por lo que es de gran importancia su estudio en la matriz acuosa.

Ya que el FCZ inhibe al miembro 4 de la subfamilia a de la familia 3 del citocromo p450 (CYP3A4) y al miembro 9 de la subfamilia c de la familia 2 del citocromo p450 (CYP2C9) (Wishart et al., 2008) puede causar efectos no deseables en organismos. De los estudios presentados anteriormente en la tabla 3, el estudio de los embriones de *Gobiocypris rarus* indicaron que se evaluaron los efectos embriotoxicos de FCZ, donde a concentración de 1 mg/L se hicieron evidentes; sin embargo no hicieron mención del tipo de malformaciones que presentaban los embriones (Zhu et al., 2014). Así mismo en otro estudio donde se trabajó con los embriones de *Danio rerio* a una exposición a bajas concentraciones de FCZ (800 – 1000 ng/L) presentaron una incidencia de edema pericárdico, deformación del saco vitelino y de cola, pero a concentraciones mayores (825-925 ng/L) se encontraron como la hipopigmentación y retraso en el desarrollo (Escobar, H. F. 2022). A diferencia de estos estudios, demostramos con una mayor especificación las malformaciones mayormente presentadas en los embriones, en nuestro estudio de *Xenopus laevis*, donde tenemos que a concentraciones menores como 0.09, 0.17 y 0.711 mg/L fueron: malformación de cola, aleta, cardiaca, cerebro, facial, edema cardiaco, abdominal, facial, óptico, enrollamiento anormal del intestino y severo, de tal modo que, para concentraciones mayores que fueron 1.26 y 2.51 mg/L, se presentó un retraso en el desarrollo de las larvas donde ya no se hicieron tan evidentes las malformaciones pero algunas que hicieron presencia fueron malformación de ano, aleta, notocorda, edema cardiaco, óptico, enrollamiento anormal del intestino y severa, pero otras malformaciones que tuvieron más relevancia en estas concentraciones fueron la craneofacial, malformación de cabeza, ojo, intestino, edema óptico, hipopigmentación. Siendo así que a bajas concentraciones las malformaciones más susceptibles a comparación con otros

estudios esta la deformación de cola y edema cardiaco y a mayores concentraciones se encuentra la hipopigmentación y retraso en el desarrollo.

Además, también se demostró que FCZ disminuyó la tasa de eclosión (Figura 7) y aumentó la tasa de malformaciones (Figura 6) de los embriones de *Xenopus laevis* con una respuesta aparentemente dependiente de la concentración y el tiempo. Las mortalidades previas a la eclosión mostraron retraso en el desarrollo, lo que indica que el FCZ causa toxicidad en el desarrollo de los embriones, lo que supone un riesgo ecotoxicológico en el desarrollo de las larvas de *Xenopus laevis*. De igual forma los cambios en el proceso de eclosión son críticos para los embriones, ya que una eclosión temprana hace que el organismo sea más susceptible a los peligros ambientales, haciendo también que estos retrasos hagan a los embriones más susceptibles a otros depredadores (Elizalde-Velázquez et al., 2021).

Los resultados obtenidos dan a conocer que la CL_{50} y la CE_{50} de malformaciones a las 96 h de exposición se obtuvieron de 2.88196 y 4.17060 mg/L respectivamente a la tabla 4. El cálculo del índice teratogénico de acuerdo con la guía estándar de la American Society for Testing Materials (2019) (ASTM E 1439-12) los valores superiores a 1.5 de IT significa que existe más probabilidad de que todos los embriones sufran malformaciones, para el presente estudio el cálculo del índice teratogénico fue de $IT = 0.691$, mostrando que el FCZ fue más embrioletal que teratogénico para los embriones de *Xenopus laevis* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes.

La inhibición del crecimiento se determinó midiendo la longitud de la cabeza a la cola de cada embrión, donde se demostró que el crecimiento de las concentraciones 1.26 y 2.51 mg/L expuestas a FCZ son significativamente diferentes del control, por lo que la concentración mínima para inhibir el crecimiento es $CMIC = 1.26$ mg/L de acuerdo con el análisis estadístico (ANOVA, LSD Fisher $p < 0.05$).

10. CONCLUSIÓN

El FCZ es un fungicida de la familia de los triazoles, presente en una variedad de medicamentos y productos de cuidado personal. Su amplio uso provoca que este compuesto termine formando parte del medio acuático. Son pocos los estudios que revelan los impactos perjudiciales que este medicamento puede tener en las especies que habitan en nuestros océanos y ríos. Así, los hallazgos de esta investigación evidencian que a concentraciones ambientalmente relevantes de FCZ impactan de manera negativa en el desarrollo de embriones/larvas de *Xenopus laevis* demostrando la toxicidad en su desarrollo, evidenciado por las distintas malformaciones presentadas, retraso en el desarrollo y disminución de la eclosión. Por lo que se sugiere que estas conclusiones obtenidas puedan ser confirmadas en otras especies acuáticas, con el uso de concentraciones ambientalmente relevantes para la obtención completa de información sobre la toxicidad del desarrollo del FCZ.

Los resultados nos permiten concluir que la exposición del FCZ a concentraciones ambientalmente relevantes altera el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*, produciendo efectos teratogénicos pero principalmente efectos letales de acuerdo al valor obtenido del índice teratogénico (IT= 0.691).

11. REFERENCIAS

1. American Society for Testing Materials, 2019. Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus* (FETAX), E1439-12. ASTM Stand. Biol. Eff. Environ. fate 11. <https://doi.org/10.1520/E1439-12> (Consultado abril 2024)
2. Anzules, Í. D. C. P., & Castro, D. W. M. (2022). Contaminación ambiental. *Recimundo*, 6(2), 93-103. Disponible en: <https://www.recimundo.com/index.php/es/article/view/1545/1979> (Consultado 16 de noviembre de 2023)
3. Assress, H. A., Nyoni, H., Mamba, B. B & Msagati, T. A. M.; (2019); "Target quantification of azole antifungals and retrospective screening of other emerging pollutants in wastewater effluent using UHPLC–QTOF-MS"; *Environmental Pollution*; 253, 655–666; doi: 10.1016/j.envpol.2019.07.075. (Consultado 27 de octubre de 2023)
4. Assress, H. A., Nyoni, H., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. M.; (2020); "Occurrence and risk assessment of azole antifungal drugs in water and wastewater"; *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 187, 109868; doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109868 (Consultado 27 de octubre de 2023)
5. Bantle, J. A., Dumont, J. N., Finch, R. A., & Linder, G. (1991). *Atlas of abnormalities: a guide for the performance of FETAX*. [Stillwater, Okla.: Printing Services, Oklahoma State University. (Consultado marzo de 2024)
6. Battistoni, M., Mercurio, S., Ficetola, G. F., Metruccio, F. C., Menegola, E., & Pennati, R. (2018). The Ascidian Embryo Teratogenicity assay in *Ciona intestinalis* as a new teratological screening to test the mixture effect of the co-exposure to ethanol and fluconazole. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 57, 76-85. DOI ELSEVIER (Consultado 25 de octubre de 2023)
7. Biblioteca del congreso nacional de chile/BCN. (2016). Calidad del agua. Disponible en: <https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/23747/2/Calidad%20del%20Agua%20Final.pdf> (Consultado 4 de enero 2025)

8. Blancas, C., & Hervás, M. E. (2008). Procesos de contaminación del agua. Contaminación de Las Aguas Por Nitratos y Efectos Sobre La Salud, 9. Consultado en: https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/salud_5af065353ff4b_contaminacion_aguas_por_nitratos.pdf (Consultado 19 de octubre de 2023)
9. Carotenuto, R., Pallotta, M. M., Tussellino, M., & Fogliano, C. (2023). *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) as a model organism for bioscience: A historic review and perspective. *Biology*, 12(6), 890. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-7737/12/6/890> (Consultado 23 de octubre de 2023)
10. Casado, J., Rodriguez, I., Ramil, M., Cela R.; (2014); "Selective determination of antimycotic drugs in environmental water samples by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry"; *J. Chromatogr. A* 1339, 42–49; doi: 10.1016/j.chroma.2014.02.087 (Consultado 27 de octubre de 2023)
11. Castro G., Casado J., Rodríguez I., Ramil M., Ferradás A & Cela R; (2016); "Time-of-flight mass spectrometry assessment of fluconazole and climbazole UV and UV/H₂O₂ degradability: kinetics study and transformation products elucidation"; *Water Research*; 88, 681e690; doi: 10.1016/j.watres.2015.10.053. (Consultado octubre de 2024)
12. Catalan M & Montejo J C; (2006); "Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética"; *Rev Iberoam Micol*; 23: 39-49. Disponible en: <https://www.reviberoammicol.com/2006-23/039049.pdf> (Consultado 06 de noviembre de 2023)
13. Checa Artos, M., Castillo, D., Ruiz-Barzola, O., & Barcos-Arias, M. (2021). Presence of pharmaceutical products in water and its impact on the environment. *Bionatura*, 6, 1618-1627. Disponible en: <https://revistabionatura.com/files/2021.06.01.27.pdf> (Consultado 20 de octubre de 2023)

14. Chen, Z. F. & Ying, G. G; (2015); “*Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review*”; *Environment International*” 84, 142-153; doi: 10.1016/j.envint.2015.07.02. (Consultado octubre de 2024)
15. Cirelli, A. F. (2012). El agua: un recurso esencial. *Química viva*, 11(3), 147-170. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/863/86325090002.pdf> (Consultado 16 de noviembre de 2023)
16. De Barros, A. L. C., Schmidt, F. F., de Aquino, S. F., Afonso, R. J. de C. F.; (2018); “Determination of nine pharmaceutical active compounds in surface waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-MS/MS”; *Environmental Science and Pollution Research*; 25(20), 19962–19974; doi:10.1007/s11356-018- 2123-y. (Consultado 28 de octubre de 2023)
17. de Carvalho, Santana, R., Schiave, L.A., Dos Santos, Quaglio, A.S., de Gaitani, C.M., Martinez, R.; (2017); “*Fluconazole Non-susceptible Cryptococcus neoformans, Relapsing/Refractory Cryptococcosis and Long-term Use of Liposomal Amphotericin B in an AIDS Patient.*”; *Mycopathologia*;182(9-10):855-861. doi: 10.1007/s11046- 017-0165-1. (Consultado octubre de 2024)
18. De la Paz, J. F., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M. S., Allende, M. L. (2017); “*Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells.*”; *Int J Mol Sci*; 18:710. (Consultado octubre de 2024)
19. Díaz, L., & Gómez, L.; (2013); “Evaluación del estrés oxidativo inducido por el efluente proveniente de una industria farmacéutica en branquias de *Cyprinus carpio* (Tesis de licenciatura)”; Universidad Autónoma del Estado de México, México. (Consultado 23 de octubre de 2023).
20. Elizalde-Velázquez, G. A (b)., Gómez-Oliván, L. M., Islas-Flores, H., Hernández- Navarro M. D., García-Medina, S., Galar-Martínez, M. (2021); “Oxidative stress as a potential mechanism by which guanlylurea disrupts the

- embryogenesis of *Danio rerio*.”; *Sci Total Environ*;799:149432. (Consultado agosto 2024)
21. Escobar Huerfano, F. (2022). Embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por fluconazol sobre *Danio rerio*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de México. (Consultado 04 de noviembre de 2023).
 22. Escobar-Huerfano, F., Elizalde-Velázquez, G. A., Gómez-Oliván, L. M., Orozco-Hernández, J. M., Rosales-Pérez, K. E., Islas-Flores, H., & Hernández-Navarro, M. D. (2022). Environmentally relevant concentrations of fluconazole alter the embryonic development, oxidative status, and gene expression of NRF1, NRF2, WNT3A, WNT8A, NRD1, and NRD2 of *Danio rerio* embryos. *Water Emerging Contaminants & Nanoplastics*, 1(1), 4. Disponible en: <https://www.oaepublish.com/articles/wecn.2021.03> (Consultado 26 de octubre de 2023)
 23. Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517. doi:10.1128/cmr.12.4.501 (Consultado 22 de octubre)
 24. Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción+ limpia*, 7(2), 52-73. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552012000200005 (Consultado 19 de octubre de 2023)
 25. González-Díaz, S. N., Lira-Quezada, C. E. D., Villarreal-González, R. V., & Canseco-Villarreal, J. I. (2022). Contaminación ambiental y alergia. *Revista alergia México*, 69, 24-30. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/ram/v69s1/2448-9190-ram-69-s1-24.pdf> (Consultado 18 de noviembre de 2023)
 26. Govindarajan, A., Bistas, K. G., Ingold, C. J., & Aboeed, A. (2023). Fluconazole. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537158/> (Consultado 22 de octubre de 2023)

27. Gregori-Valdes B. S; (2005); "Estructura y actividad de los antifúngicos."; Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v39n2/far12205.pdf> (Consultado 06 de noviembre de 2023)
28. GropPELLI, S., Zega, G., Biggiogero, M., De Bernardi, F., Sotgia, C., Pennati, R., 2007. Fluconazole induces teratogenic effects in the tunicate *Phallusia mammillata*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 265–271. DOI ELSEVIER (Consultado 28 de enero de 2023)
29. Hernández, F. G. (2000). El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. *Revista de Toxicología*, 17(1), 19-26. Disponible en: <https://www.ugr.es/~fgil/biomarcadoresrevtoxicol.pdf> (Consultado 23 de octubre de 2023)
30. Huang, Q., Wang, Z., Wang, C., Peng, X.; (2013); "Perfilado quiral de antifúngicos azoles en aguas residuales municipales y ríos receptores del delta del río Pearl, China"; *Investigación en ciencias ambientales y contaminación*, 20 (12), 8890–8899; doi: 10.1007 / s11356-013-1862-z (Consultado 28 de octubre de 2023)
31. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" – Higiene a la Vanguardia de la Salud Pública. (2022). Fluconazol. Disponible en: http://inhrr.gob.ve/fichasfarma/archivos/20221118110434_1047.pdf (Consultado 22 de octubre de 2023)
32. Islas, F. H. (2018). *Xenopus*: bioindicador modelo en pruebas de laboratorio. *Universitaria*, 1 (3), 20-21. Disponible en: <https://revistauniversitaria.uaemex.mx/article/view/9437/7896> (Consultado 23 octubre de 2022)
33. Kahle. M., Buerge, I. J., Hauser, A., Muller, M. D & Poiger, T; (2008); "Azole fungicides: occurrence and fate in wastewaters and surface Waters"; *Environ. Sci. Technol.* 42, 7193–7200. (Consultado 28 de octubre de 2023)
34. Katti, P. A., Goundadkar, B. B; (2020); "Azole pharmaceuticals induce germinal vesicle breakdown (GVBD) in preovulatory oocytes of zebrafish (*Danio rerio*):

- an in vitro study”; Environmental Science and Pollution Research; doi:10.1007/s11356-020-10719-x (Consultado 25 de noviembre de 2023)
35. Kim, J. W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., & Arizono, K. (2009). Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *The Journal of toxicological sciences*, 34(2), 227-232. DOI PubMed (Consultado 25 de octubre de 2023)
36. Liu, X., Lu, S., Guo, W., Xi, B. & Wang., W.; (2018); “Antibiotics in the aquatic environments: A review of lakes, China”; Sci. Total Environ. 627, 1195–1208; doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.01.271. (Consultado agosto de 2024)
37. Mangrulle, V., Pore, Y., & Disouza, J. (2017). Synthesis and physicochemical studies of fluconazole ionic liquids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(11), 084-089. Disponible en: https://japsonline.com/admin/php/uploads/2476_pdf.pdf (Consultado 22 de octubre de 2023)
38. Mujica, M, T. (2018). Antifúngicos. Facultad de medicina de Buenos Aires. Disponible en: <https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2019-05/teorico%2018.pdf> (Consultado 25 de octubre de 2023)
39. Nasrollahi, Z., Yadegari, M.H., Roudbar, Mohammadi. S., Roudbary, M., Hosseini, Poor, M., Nikoomanesh, F., Rajabi, Bazl, M.; (2015); “Fluconazole Resistance *Candida albicans* in Females With Recurrent Vaginitis and Pir1 Overexpression.”; Jundishapur J Microbiol; 23;8(9):e21468; doi: 10.5812/jjm.21468.
40. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 3365, Fluconazole. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluconazole> (Consultado 30 de octubre de 2023)
41. NICEATM. (2000). Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). NIEHS. Disponible en:

<https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/docs/fetax2000/brd/fetax-brd-all.pdf> (Consultado 23 de octubre de 2023)

42. Nocua-Báez, L. C., Uribe-Jerez, P., Tarazona-Guaranga, L., Robles, R., & Cortés, J. A. (2020). Azoles de antes y ahora: una revisión. *Revista chilena de infectología*, 37(3), 219-230. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182020000300219 (Consultado 18 de noviembre de 2023)
43. Palomaki, A. C. (2010). Toxicity and mode of action of the pharmaceutical fungicides Fluconazole and Terbinafine to freshwater algae. Disponible en <https://odr.chalmers.se/server/api/core/bitstreams/f32f2710-f4d8-49cf-93cd-ca5fcca0f37a/content> (Consultado 28 de octubre de 2023)
44. Pathadka, S., Yan, V. K., Neoh, C. F., Al-Badriyeh, D., Kong, D. C., Slavin, M. A., ... & Chan, E. W. (2022). Global consumption trend of antifungal agents in humans from 2008 to 2018: data from 65 middle-and high-income countries. *Drugs*, 82(11), 1193-1205. (Consultado 04 de noviembre de 2023)
45. Reis, E. O., Foureaux, A. F. S., Rodrigues, J. S., Moreira, V. R., Lebron, Y. A. R., Santos, L. V. S., Lange, L. C.; (2019); "Occurrence, removal and seasonal variation of pharmaceuticals in Brazilian drinking water treatment plants."; *Environmental Pollution*. doi:10.1016/j.envpol.2019.04.102. (Consultado 28 de octubre de 2023)
46. Rojas Leonart, Isaias; García Gasca, Silvia Alejandra; Bárcenas Ibarra, Annelisse Teratogénesis; consideraciones y actualización REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 16, núm. 9, 2015, pp. 1-16 Veterinaria Organización Málaga, España. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63641785001.pdf> (Consultado 23 de octubre de 2023)
47. Santiago Téllez, A. (2014). *Determinación del efecto antimicótico de Ketoconazol incorporado en cristales líquidos liotrópicos en C. albicans* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco). Disponible en:

<https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/2317/1/181407.pdf>

(Consultado 25 de octubre de 2023)

48. Santos, A. V., Couto, C. F., Lebron, Y. A., Moreira, V. R., Foureaux, A. F. S., Reis, E. O., Santos, L. V. S., de Andrade, L. H., Amaral, M. C. S., Lange, L. C.; (2020); "Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in water supply systems in Brazil"; *Science of The Total Environment*, 141011. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.1410. (Consultado 30 de octubre de 2023)
49. Stockmann, C., Constance, J. E., Roberts, J. K., Olson, J., Doby, E. H., Ampofo, K., ... & Sherwin, C. M. (2014). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals in children and their clinical implications. *Clinical pharmacokinetics*, 53, 429-454. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/144177819.pdf> (Consultado 22 de octubre de 2023)
50. Westlund, P., & Yargeau, V.; (2017); "Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays."; *Science of The Total Environment*, 607-608, 744–751. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.0. (Consultado 30 de octubre de 2023)
51. Wishart DS, Knox C, Guo AC, et al. DrugBank: una base de conocimiento sobre fármacos, acciones farmacológicas y objetivos farmacológicos. *Nucleic Acids Res* 2008;36: D901-6. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm958> (Consultado 28 de julio de 2024)
52. Zhu, B., Liu, L., Gong, Y. X., Ling, F., & Wang, G. X. (2014). Triazole-induced toxicity in developing rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 13625-13635. DOI PubMed (Consultado 26 de octubre de 2023)
53. Zuarth, G., Alberto, C., Jiménez, P., Pfeng, L., & Antonio, M. (2014). Bioindicadores guardianes de nuestro futuro ambiental. Disponible en: <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1752/1/PUB-CAPITULOS-LIBROS-961.PDF> (Consultado 23 de octubre de 2023)

54. Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 442–448. doi:10.1016/j.ijheh.2011.08.002 (Consultado Agosto de 2024)
55. Carvalho, I. T., & Santos, L; (2016).; “Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario.”; *Environment International*; 94, 736–757. doi:10.1016/j.envint.2016.06.025. (Consultado agosto de 2024)

12. ANEXOS

Malformaciones de las larvas expuestas a 0.09 mg/L de FCZ durante 96 horas.



Figura 1. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.904 mm, sin malformaciones aparentes.



Figura 2. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.736 mm, sin malformaciones aparentes.



Figura 3. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.724 mm, con malformación de cola.



Figura 4. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.699 mm, con malformación de cola.



Figura 5. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.698 mm, con malformación de la notocorda.



Figura 6. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.662 mm, con malformación de la cola.

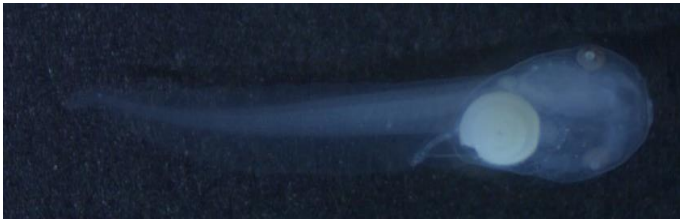


Figura 7. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.640 mm, con malformación de la cola.



Figura 8. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.605 mm, con malformación de la aleta.



Figura 9. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.602 mm, sin malformaciones aparentes



Figura 10. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.597 mm, con enrollamiento anormal de intestino, edema abdominal, cardiaco, óptico, facial, malformación facial, cola, cabeza y ano, craneofacial.



Figura 11. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.580 mm, con malformación de cola.



Figura 12. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.543 mm, sin malformaciones aparentes



Figura 13. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.519 mm, con malformación de cola.



Figura 14. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.499 mm, con edema óptico leve con hipo pigmentación, malformación de cola y ojo.



Figura 15. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.476 mm, con malformación de notocorda.



Figura 16. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.453 mm, con edema óptico leve e hipo pigmentación, edema cardiaco, malformación de cola y ojo.



Figura 17. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.435 mm, con edema cardiaco y malformación de cola.



Figura 18. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.431 mm, con malformación de cola.



Figura 19. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.429 mm, sin malformaciones aparentes



Figura 20. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.406 mm, sin malformaciones aparentes



Figura 21. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.361 mm, con malformación de notocorda.

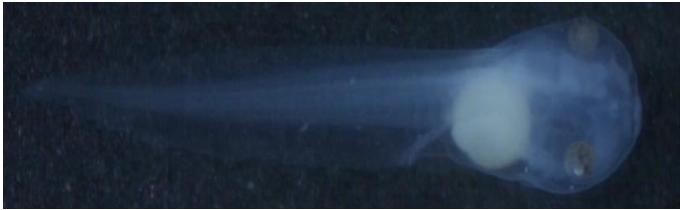


Figura 22. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.352 mm, sin malformaciones aparentes.



Figura 23. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.341 mm, con malformación de notocorda y de cola.



Figura 24. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.334 mm, sin malformaciones aparentes.



Figura 25. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.328 mm, con edema cardiaco y malformación de ano.



Figura 26. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.263 mm, con edema cardiaco.



Figura 27. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.208 mm, con malformación de aleta y ojo.



Figura 28. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.205 mm, sin malformaciones aparentes.



Figura 29. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.175 mm, con malformación de cola.

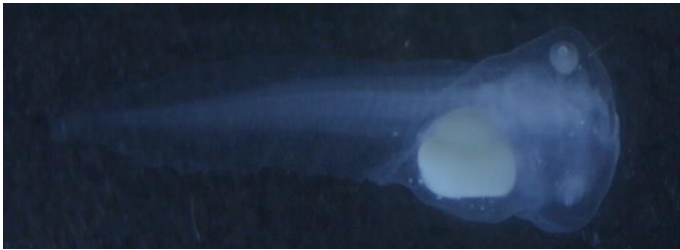


Figura 30. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.158 mm, con enrollamiento anormal del intestino, edema abdominal, cardiaco, óptico y facial, malformación ano y cola.



Figura 31. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.155 mm, con malformación de aleta, ojo y cola.



Figura 32. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.144 mm, sin malformaciones aparentes.



Figura 33. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.100 mm, con malformación de ojo y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 34. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.096 mm, con malformación de cola y edema cardiaco.



Figura 35. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.052 mm, con malformación de cola, edema cardiaco, abdominal, óptico y facial.



Figura 36. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.009 mm, con malformación de aleta, ano y cola.



Figura 37. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.007 mm, con malformación de notocorda.



Figura 38. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.932 mm, con malformación de cola.

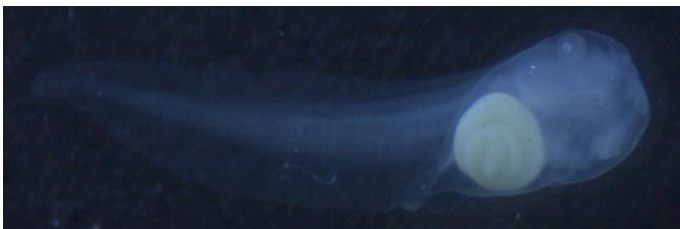


Figura 39. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.773 mm, con malformación de cola, notocorda, ano y edema cardiaco.



Figura 40. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.747 mm, sin malformaciones aparentes.

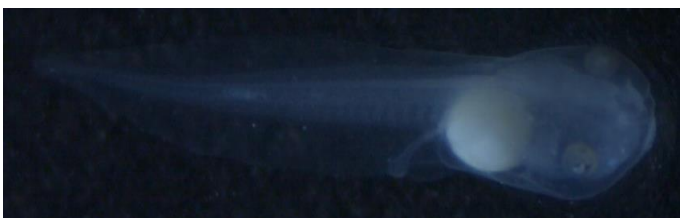


Figura 41. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.744 mm, sin malformaciones aparentes.



Figura 42. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.722 mm, con edema cardiaco.



Figura 43. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.717 mm, con malformación de aleta.



Figura 44. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.571 mm, con Edema abdominal, cardiaco y facial, malformación óptica, intestinal, cardiaca, cabeza, ano, cola, facial y de notocorda, craneofacial.



Figura 45. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.743 mm, con Edema abdominal, cardiaco y facial, así como malformaciones ópticas, intestinal, cardiaca, ano, cola, facial y cabeza, craneofacial.

Malformaciones de las larvas expuestas a 0.17 mg/L de FCZ durante 96 horas.



Figura 46. Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.185 mm, con malformación de cola.



Figura 47. Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.117 mm, con malformación de cola y aleta.



Figura 48. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.874 mm, con malformación de aleta.



Figura 49. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.821 mm, con malformación de notocorda.



Figura 50. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.797 mm, con malformación de cola.



Figura 51. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.786 mm, con malformación de notocorda y cola.



Figura 52. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.705 mm, con malformación de cola y aleta.



Figura 53. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.653 mm, con malformación de notocorda.

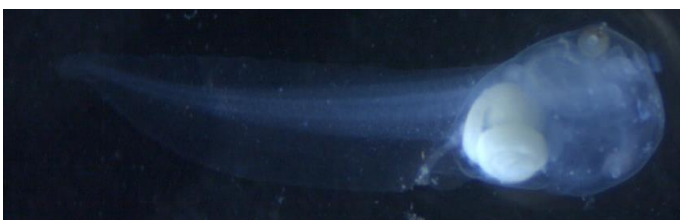


Figura 54. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.637 mm, con malformación de cola.



Figura 55. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.624 mm, con malformación de cola y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 56. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.593 mm, con malformación de cola.



Figura 57. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.517 mm, sin malformaciones aparentes.



Figura 58. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.488 mm, con malformación de cola.



Figura 59. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.487 mm, sin malformaciones aparentes.



Figura 60. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.448 mm, con malformación de cola, notocorda y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 61. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.442 mm, con malformación de notocorda y cola.



Figura 62. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.437 mm, con malformación de cola y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 63. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.437 mm, con malformación de cola, ano, aleta, enrollamiento anormal del intestino y edema óptico.



Figura 64. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.409 mm, con malformación de aleta.



Figura 65. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.408 mm, con malformación de aleta y cola.



Figura 66. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.396 mm, con malformación de notocorda.



Figura 67. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.394 mm, con malformación de ano, aleta y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 68. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.351 mm, con malformación de aleta.



Figura 69. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.341 mm, con malformación de cola y edema cardiaco.



Figura 70. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.321 mm, con edema cardiaco.



Figura 71. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.316 mm, con malformación de notocorda y aleta.



Figura 72. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.285 mm, con malformación de notocorda, ojo y edema cardiaco.



Figura 73. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.271 mm, con malformación de notocorda.



Figura 74. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.232 mm, con malformación de cola y edema cardiaco.



Figura 75. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.216 mm, con malformación de notocorda.



Figura 76. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.176 mm, con malformación de notocorda y edema óptico.



Figura 77. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.144 mm, con malformación de notocorda, aleta, ojo y edema óptico.

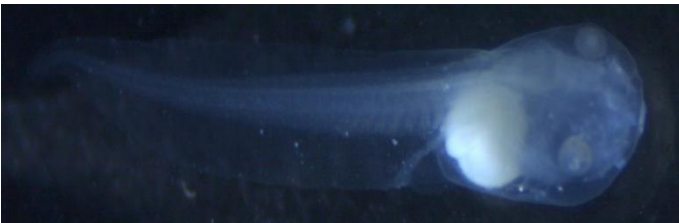


Figura 78. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.129 mm, con malformación de cola, ojo y edema cardíaco.

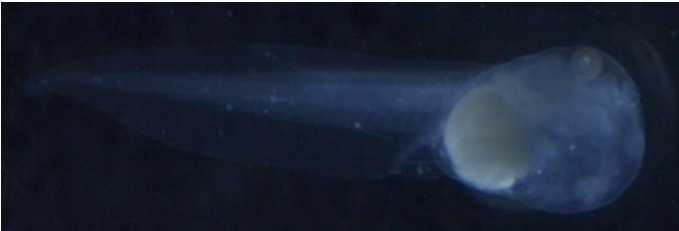


Figura 79. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.122 mm, con malformación de cola.



Figura 80. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.066 mm, con malformación de cola y aleta.



Figura 81. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.015 mm, con malformación de notocorda y edema cardíaco.



Figura 82. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.976 mm, con malformación de ano, cola y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 83. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.906 mm, con malformación de ano, cola, enrollamiento anormal del intestino y edema cardiaco.



Figura 84. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.871 mm, con malformación de cola, ojo y aleta.



Figura 85. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.613 mm, con malformación de notocorda, cola, ano, aleta, enrollamiento anormal del intestino y edema cardiaco.



Figura 86. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.543 mm, con malformación de cola, ano, ojo, enrollamiento anormal del intestino y edema cardiaco.



Figura 87. Larva de rana *Xenopus laevis*, 4.812 mm, con tubo neural fallo durante la neurulación por lo que no hubo desarrollo de cerebro, los demás órganos están malformados, edema abdominal y cardiaco grave. Severa.

Malformaciones de las larvas expuestas a 0.711 mg/L de FCZ durante 96 horas.



Figura 88. Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.169 mm, con malformación de cola, ano y edema cardiaco.



Figura 89. Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.109 mm, con malformación de cola, ano y aleta.



Figura 90. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.991 mm, con malformación de cola.

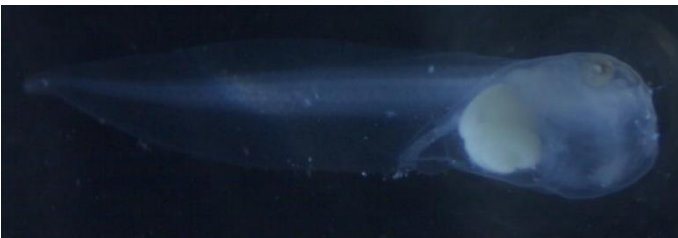


Figura 91. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.978 mm, con malformación de cola, ano y edema cardiaco.



Figura 92. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.976 mm, con malformación de aleta, ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 93. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.971 mm, con malformación de aleta y edema óptico.



Figura 94. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.950 mm, con malformación de aleta y cola.



Figura 95. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.924 mm, con malformación de notocorda y cola.



Figura 96. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.889 mm, con malformación de ano, cola y edema cardiaco.



Figura 97. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.889 mm, con malformación de ano y cola.



Figura 98. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.860 mm, con malformación de ano y cola.



Figura 99. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.850 mm, con malformación de ano, cola, aleta y notocorda.



Figura 100. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.829 mm, con malformación de ano, cola, aleta, ojo y edema cardiaco.



Figura 101. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.787 mm, con malformación de ano, cola y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 102. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.751 mm, con malformación de ano, cola y aleta.



Figura 103. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.642 mm, con malformación de ano, cola y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 104. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.610 mm, con malformación de ano, cola, aleta, enrollamiento anormal del intestino, edema cardiaco y óptico.



Figura 105. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.575 mm, con malformación de ojo, cola, aleta, enrollamiento anormal del intestino.



Figura 106. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.567 mm, con malformación de ano, cola, notocorda y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 107. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.467 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino y edema cardiaco.



Figura 108. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.457 mm, con malformación de ano, cola y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 109. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.439 mm, con malformación de ojo, aleta y edema óptico.



Figura 110. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.407 mm, con malformación de ano, cola, ojo, aleta y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 111. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.405 mm, con malformación de ano, cola, ojo, aleta y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 112. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.260 mm, con malformación de ano, cola, ojo, aleta y enrollamiento anormal del intestino, edema cardiaco, óptico e hipo pigmentación.



Figura 113. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.901 mm, con malformación de aleta, enrollamiento anormal del intestino y edema cardiaco.



Figura 114. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.883 mm, con malformación de ano, cola, aleta y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 115. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.771 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 116. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.620 mm, con malformación de ano, cola, ojo, aleta y notocorda.



Figura 117. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.479 mm, con malformación de ano, cola, notocorda y edema cardiaco.



Figura 118. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.301 mm, con malformación de aleta, cola, notocorda.

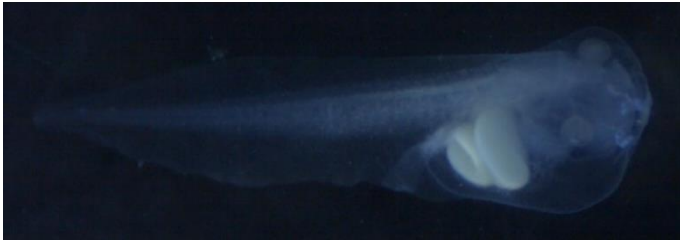


Figura 119. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.186 mm, con enrollamiento anormal del intestino, edema cardiaco, abdominal, facial y óptico, malformación de ano, facial, cabeza y aleta. craneofacial.



Figura 120. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.947 mm, con enrollamiento anormal del intestino, edema cardiaco, malformación de ano, cola, notocorda y aleta.

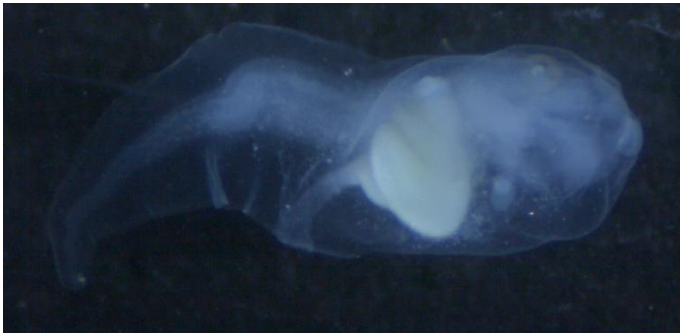


Figura 121. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.701 mm, con reducción del tamaño del cerebro (anormal), frente arqueada, anomalía facial, cola, ano, notocorda, cabeza e intestino, craneofacial, así como restricción de crecimiento, edema grave abdominal, facial, óptico y cardiaco. Severa.

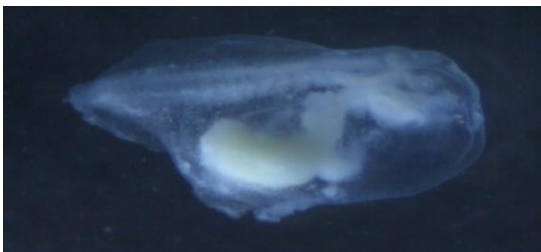


Figura 122. Larva de rana *Xenopus laevis*, 4.205 mm, el tubo neural fallo durante la neurulación por lo que no hubo desarrollo de cerebro y los demás órganos están malformados, longitud corta, edema grave abdominal y cardiaco, craneofacial. Severa

Malformaciones de las larvas expuestas a 1.005 mg/L de FCZ durante 96 horas.



Figura 123. Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.539 mm, con malformación de ano, cola y edema cardiaco.



Figura 124. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.959 mm, con malformación de ano, cola, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino

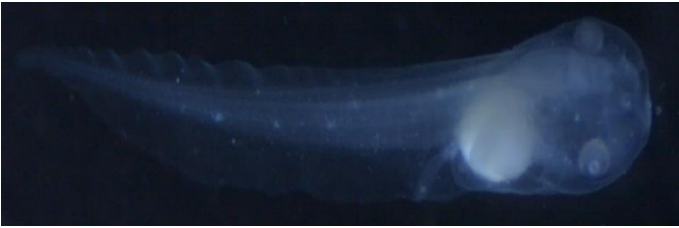


Figura 125. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.941 mm, con malformación de aleta, cola, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino



Figura 126. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.850 mm, con malformación de cola, edema óptico leve, hipo pigmentación y enrollamiento anormal del intestino.

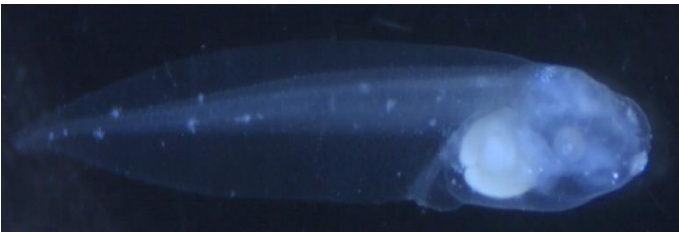


Figura 127. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.751 mm, con malformación de ano, aleta, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 128. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.734 mm, con malformación de cola y ojo.



Figura 129. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.677 mm, con malformación de cola, aleta y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 130. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.633 mm, con malformación de cola, aleta y ojo.



Figura 131. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.629 mm, con malformación de ano, notocorda, aleta y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 132. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.628 mm, con malformación de notocorda, aleta y ano.



Figura 133. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.541 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 134. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.509 mm, con malformación de ano, notocorda, cola, aleta, ojo y edema cardiaco.



Figura 135. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.448 mm, con malformación de ano, cola, aleta, ojo y edema cardiaco.



Figura 136. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.445 mm, con malformación de ano, aleta y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 137. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.429 mm, con malformación de ano, notocorda, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 138. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.356 mm, con malformación de ano, notocorda, cola y edema cardiaco.



Figura 139. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.239 mm, con malformación de ano, notocorda, cola, edema cardiaco, óptico y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 140. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.083 mm, con malformación de ano, aleta, cola, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 141. Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.076 mm, con malformación de ano, aleta, cola, edema cardiaco, óptico y enrollamiento anormal del intestino.

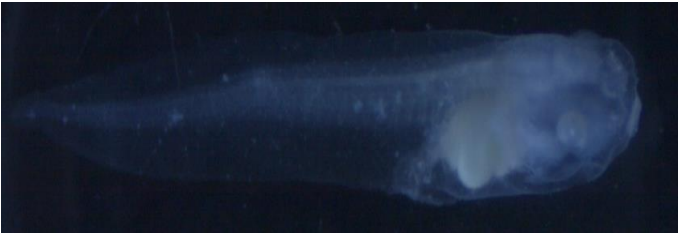


Figura 142. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.963 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardíaco, óptico, enrollamiento anormal del intestino e hipo pigmentación.



Figura 143. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.956 mm, con malformación de ano, edema cardíaco y enrollamiento anormal del intestino.

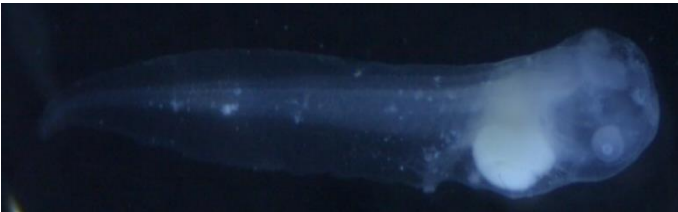


Figura 144. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.954 mm, con malformación de cola, aleta, ano y enrollamiento anormal del intestino.

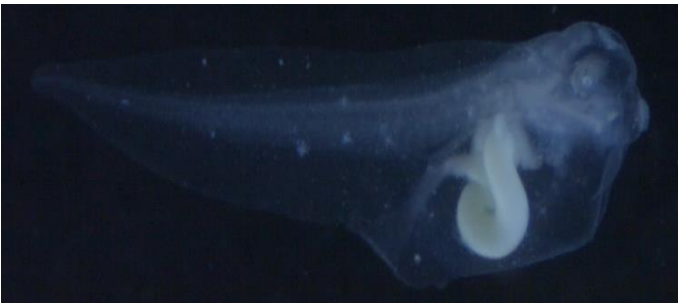


Figura 145. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.918 mm, con edema grave abdominal, facial y cardíaco, desarrollo anormal de la cabeza y facial, malformación del ojo, notocorda, ano, cerebro y un bobinado intestinal inadecuado (malformado). craneofacial. severa.



Figura 146. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.662 mm, con malformación de cola, ano, enrollamiento anormal del intestino y edema cardíaco.

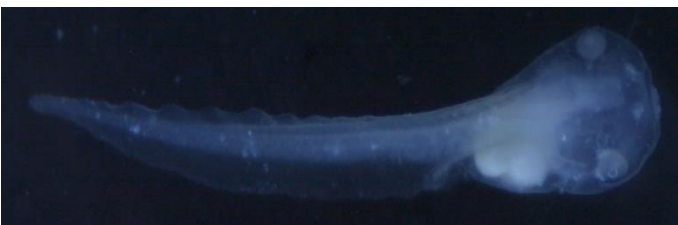


Figura 147. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.646 mm, con malformación de aleta, ano, notocorda y enrollamiento anormal del intestino.

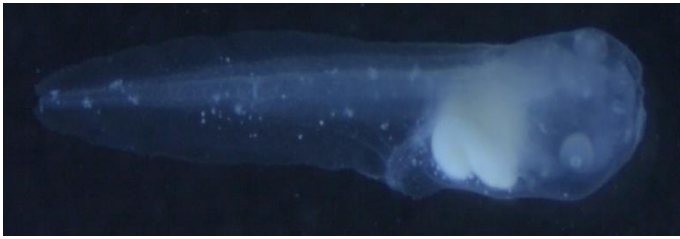


Figura 148. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.485 mm, con malformación de cola, aleta, ano, enrollamiento anormal del intestino, edema cardiaco y óptico.



Figura 149. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.143 mm, con malformación de cola, aleta, ano, enrollamiento anormal del intestino, edema cardiaco, óptico y facial.

Malformaciones de las larvas expuestas a 1.26 mg/L de FCZ durante 96 horas.

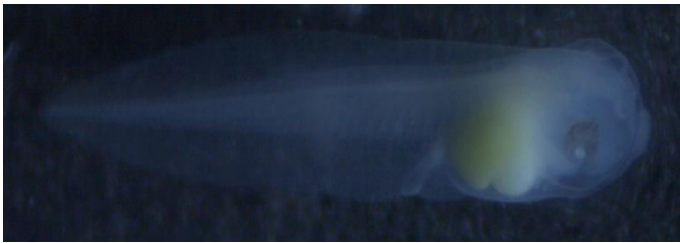


Figura 150. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.512 mm, con malformación de ojo, notocorda, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 151. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.342 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 152. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.270 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 153. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.241 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 154. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.228 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 155. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.214 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 156. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.167 mm, con malformación de ojo, aleta y enrollamiento anormal del intestino.

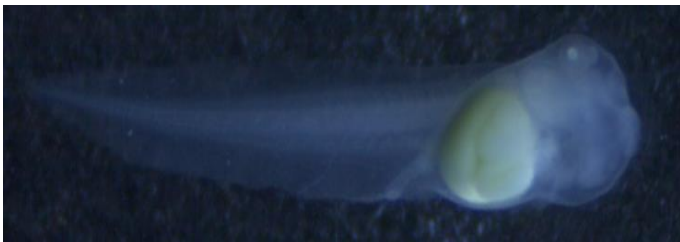


Figura 157. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.151 mm, con enrollamiento anormal del intestino.



Figura 158. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.030 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.

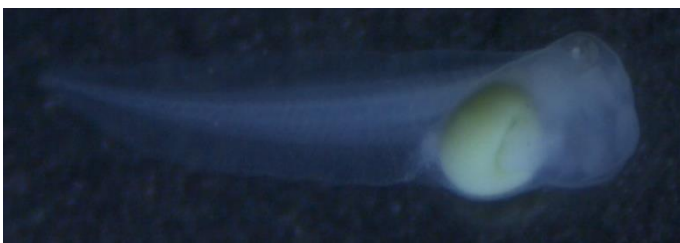


Figura 159. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.999 mm, con malformación de ano, notocorda y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 160. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.959 mm, con malformación de ano, notocorda, cola, aleta, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 161. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.949 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 162. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.888 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 163. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.886 mm, con malformación de ano, ojo y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 164. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.885 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 165. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.850 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 166. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.849 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 167. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.825 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 168. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.810 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.

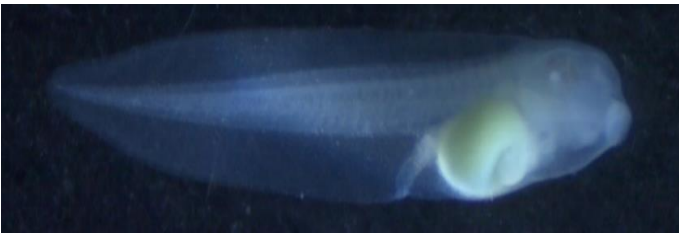


Figura 169. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.806 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 170. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.777 mm, con malformación de ano, cola, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 171. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.762 mm, con malformación de ano, aleta, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 172. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.713 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 173. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.710 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 174. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.697 mm, con malformación de ano, edema cardiaco.



Figura 175. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.653 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardiaco.



Figura 176. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.582 mm, con malformación de ojo, edema cardiaco.



Figura 177. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.580 mm, con malformación de ano, notocorda, edema cardiaco.

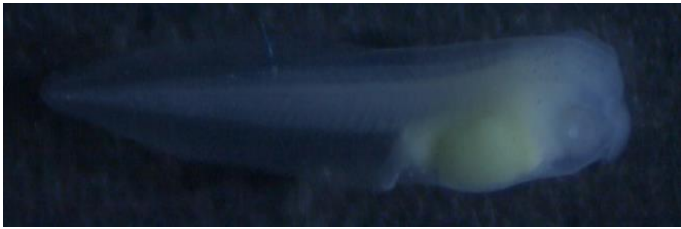


Figura 178. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.553 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 179. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.544 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 180. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.535 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 181. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.501 mm, con malformación de ano, ojo y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 182. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.431 mm, con malformación de ano, ojo, notocorda, cola y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 183. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.412 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.

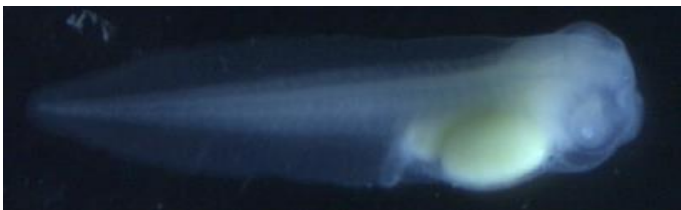


Figura 184. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.161 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.

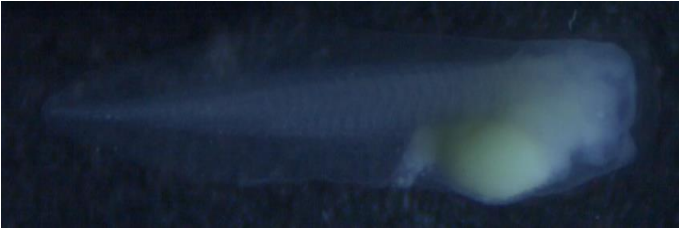


Figura 185. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.139 mm, con malformación de ano, craneofacial, edema cardíaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 186. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.117 mm, con malformación de ano, edema cardíaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 187. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.002 mm, con malformación de cola, notocorda, ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 188. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.994 mm, con malformación de cola, notocorda, ano, ojo y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 189. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.954 mm, con malformación de ano, edema cardíaco y enrollamiento anormal del intestino.

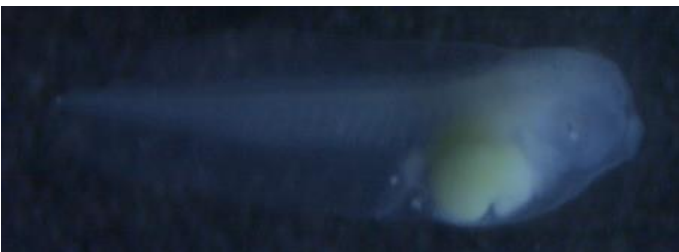


Figura 190. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.915 mm, con malformación de ano, ojo, aleta, cola, edema cardíaco y enrollamiento anormal del intestino.

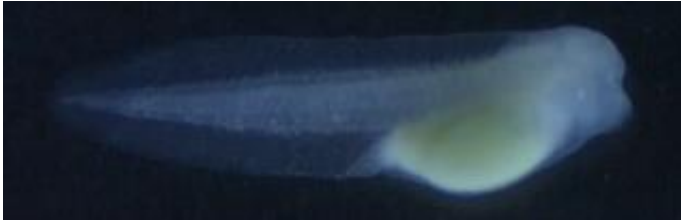


Figura 191. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.856 mm, con malformación de ano, cabeza, intestino y craneofacial.

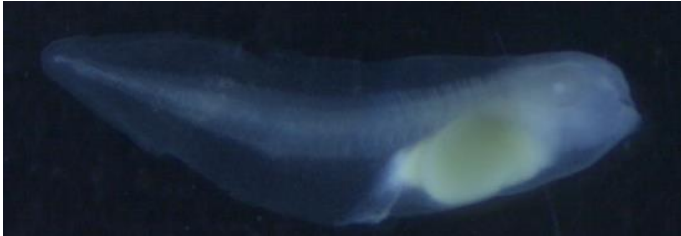


Figura 192. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.809 mm, con malformación de ano, cabeza, aleta, notocorda, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 193. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.797 mm, con malformación de ano, ojo, craneofacial y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 194. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.617 mm, con malformación de ano e intestino.



Figura 195. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.589 mm, con malformación de ano, intestino y craneofacial.



Figura 196. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.511 mm, con malformación de ano e intestino.



Figura 197. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.187 mm, con malformación de ano, ojo, facial, cabeza e intestino.



Figura 198. Larva de rana *Xenopus laevis*, 5.632 mm, con malformación de ano, ojo, facial, cabeza, aleta, intestino y edema cardiaco.

Malformaciones de las larvas expuestas a 2.51 mg/L de FCZ durante 96 horas.



Figura 199. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.557 mm, con malformación de ano, ojo, notocorda, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.

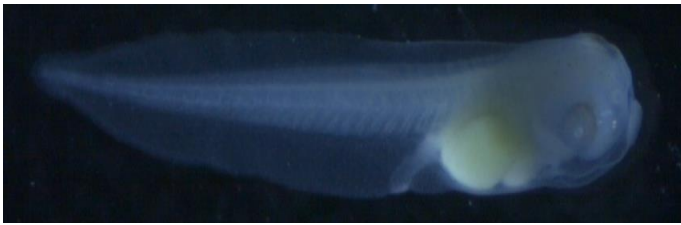


Figura 200. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.529 mm, con malformación de ano, ojo, cola, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 201. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.516 mm, con malformación de ano, cola y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 202. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.461 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 203. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.431 mm, con malformación de ano, aleta, notocorda y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 204. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.376 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 205. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.360 mm, con malformación de ano, ojo, aleta y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 206. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.337 mm, con malformación de ano, ojo, cola, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 207. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.329 mm, con malformación de ano, ojo y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 208. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.329 mm, con malformación de aleta, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 209. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.315 mm, con malformación de ano, ojo, notocorda, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 210. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.259 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.

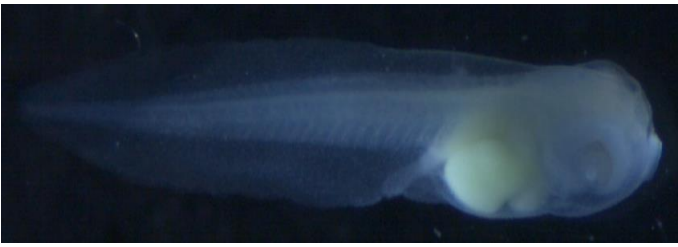


Figura 211. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.223 mm, con malformación de ano, ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 212. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.217 mm, con malformación de ojo, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.

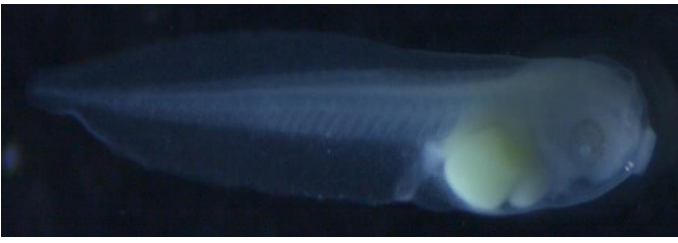


Figura 213. Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.130 mm, con malformación de ojo, ano, aleta, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 214. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.971 mm, con edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 215. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.938 mm, con malformación de ojo, ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 216. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.897 mm, con malformación de ano, edema cardíaco y enrollamiento anormal del intestino.

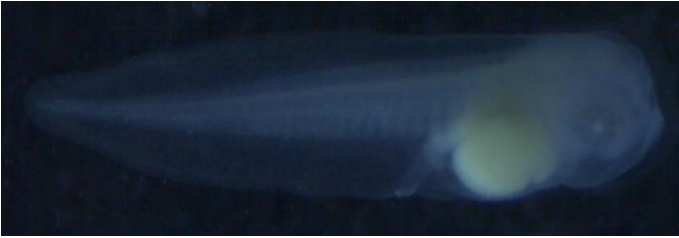


Figura 217. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.873 mm, con malformación de ano, edema cardíaco y enrollamiento anormal del intestino.

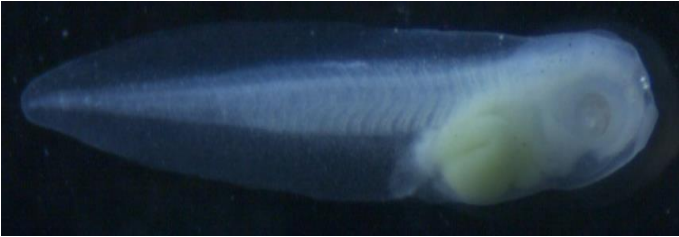


Figura 218. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.872 mm, con malformación de ano, edema cardíaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 219. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.860 mm, con malformación de ano, ojo, notocorda, intestino y edema cardíaco.



Figura 220. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.859 mm, con malformación de ano, aleta, edema cardíaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 221. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.849 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.

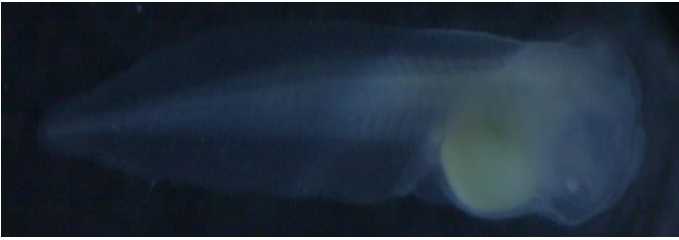


Figura 222. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.848 mm, con malformación de ano, notocorda, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.

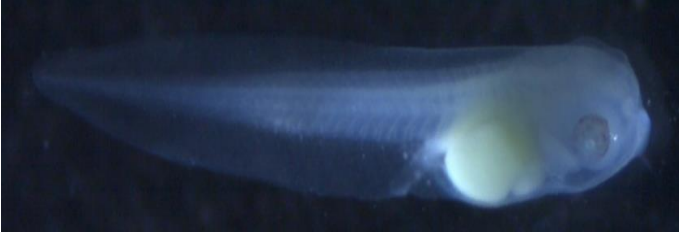


Figura 223. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.845 mm, con malformación de ano, ojo y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 224. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.835 mm, con malformación de ano, cola, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 225. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.765 mm, con malformación de ojo y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 226. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.725 mm, con malformación de ojo, ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 227. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.704 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.

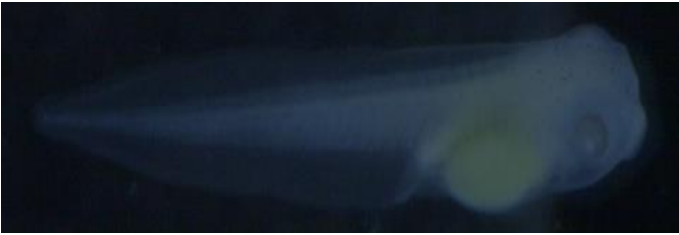


Figura 228. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.688 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 229. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.603 mm, con malformación de ano, ojo y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 230. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.578 mm, con malformación de ano, ojo y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 231. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.541 mm, con malformación de ano, ojo, notocorda, cola, aleta, ruptura en el tubo neural y enrollamiento anormal del intestino.

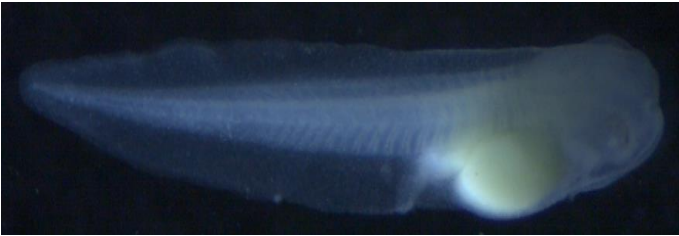


Figura 232. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.499 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.

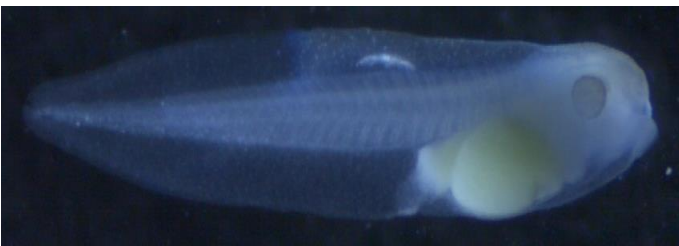


Figura 233. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.357 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 234. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.283 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 235. Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.176 mm, con malformación de ano, edema cardiaco y enrollamiento anormal del intestino.

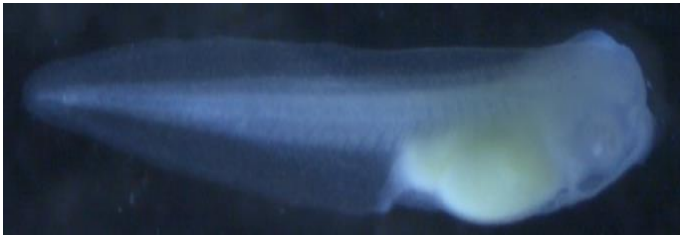


Figura 236. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.993 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.



Figura 237. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.989 mm, con malformación de ano y enrollamiento anormal del intestino.

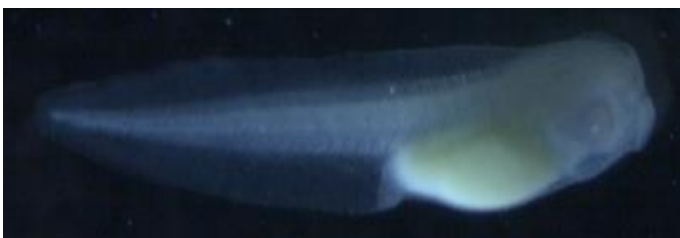


Figura 238. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.927 mm, con malformación de ano, ojo y enrollamiento anormal del intestino.

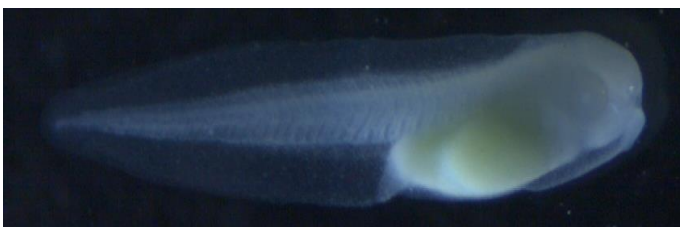


Figura 239. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.743 mm, con malformación de ano, ojo, intestino y edema cardiaco.

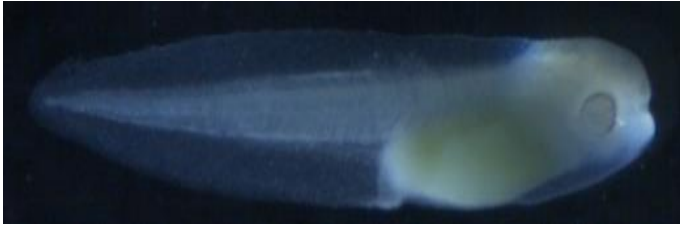


Figura 240. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.721 mm, con malformación de ano, ojo, intestino y edema cardiaco.



Figura 241. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.502 mm, con malformación de ano, ojo, intestino, cabeza, facial y craneofacial.



Figura 242. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.465 mm, con malformación de ano, ojo, intestino, cabeza, hipo pigmentación y craneofacial.



Figura 243. Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.048 mm, con malformación de ano, ojo, intestino, cabeza, cola y craneofacial.