



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Centro de
Investigación en
Dinámica Celular

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS**

Área terminal de bioquímica y biología molecular

**Impacto de la carbamazepina en el desarrollo embrionario del
pez cebra**

TESIS

QUE PRESENTA:

Joseph Lenin Carrasco Torres

Para obtener el Grado de:
LICENCIADO EN CIENCIAS

Director de la Tesis:
Dra. Denhí Schnabel Peraza

Sinodales:

Dra. Verónica Mercedes Narvèez Padilla
(Centro de Investigación y dinámica celular, UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García
(Centro de Investigación y dinámica celular, UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
(Centro de Investigación En Biotecnología, UAEM)

Dra. Liliana Pardo López
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Agradecimientos

A todas las instituciones y personas que en el paso de mi vida han puesto su dedicación y apoyo en guiarme para ser la persona que soy actualmente, no lo habría logrado sin el granito de arena de cada uno. Principalmente a mi mamá y hermano que les queda corto el agradecimiento en una tesis, pero sí de forma poética expreso su ayuda como granitos de arena, ellos formaron un desierto para mí.

Gracias a Astrid y Dana, son lo mejor que me paso en la universidad.

Gracias a una personita especial por abrirme su mundo y alegrar el mío.

Gracias a mis abuelos, mi fuente de inspiración y la razón por la que llegue aquí.

Gracias a la Dra. Denhí por brindarme soporte y abrirme el paso al mundo de la ciencia. Al Dr. Jonathan Ricardo Rosas, a la M. en C. Laura Ramírez Ángeles, a M. en C. Andrea Cazares y Martin por haber compartido conmigo este proyecto, gracias por su dedicación y tiempo para tunearme como profesional.

Gracias al laboratorio 15 del IBt UNAM, a la Dra. Hilda Lomelí Buyoli por permitirme ser parte de su lab, al Dr. Enrique Salas Vidal por sus consejos en los seminarios y a M. en C. Dulce I. Benítez Pacheco.

Financiamiento de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) 2022 con el proyecto IN208122 “Caracterización molecular de los efectos de los microcontaminantes orgánicos durante el desarrollo embrionario de pez cebra”

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	6
1.1 Contaminación del agua.....	6
1.2 Contaminantes emergentes	7
1.3 Carbamazepina como contaminante emergente	¡Error! Marcador no definido.
1.4 Pez cebra como modelo experimental para el análisis de contaminantes del agua	11
CAPÍTULO 2: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA:	12
2.1 Antecedentes	12
2.2 Cuantificación de contaminantes en la PTAR Cerro de la Estrella	12
2.3 Ensayo toxicológico del influente y efluente de la PTAR “Cerro de la Estrella”	13
2.4 Efecto toxicológico de la CBZ usando el pez cebra como modelo experimental	15
2.5 Justificación	17
2.6 Hipótesis	17
2.7 Objetivo general	17
2.8 Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	18
3.1 Cría del pez cebra y recolección de embriones modificado de (ZFIN: Zebrafish Book: Contents, 2000)	18
3.2 Prueba toxicológica	18
3.3 Ensayo de comportamiento natatorio (modificado de Goody et al, 2013)	19
3.4 Adquisición de vídeo:	20
3.5 Análisis de vídeos:	21
3.6 Estadística:	21
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	22
4.1 Supervivencia	22
4.2 Cambios en la sensibilidad a estímulos mecánico-táctiles	24
4.3 Clasificación de los patrones de nado en larvas de pez cebra	25
4.4 Análisis de motilidad.....	26
4.5 Desplazamiento máximo y movimiento errático.....	28
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	30
5.1 Supervivencia	30
5.2 Efectos en la motilidad de larvas de pez cebra.....	30
CAPÍTULO 6 CONCLUSIÓN	34
Perspectivas futuras:	¡Error! Marcador no definido.
REFERENCIAS	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Frecuencias de detección de Ingredientes Farmacéuticos Activos (APIs).....	9
Figura 2: Ensayo toxicológico del tren de tratamiento secundario de la PTAR Cerro de la Estrella.	14
Figura 3: Distancias recorridas de larvas de pez cebra durante el estadio de 72 hpf expuestos al efluente secundario de la PTAR “Cerro de la Estrella”..	14
Figura 4: Distancias recorridas de larvas de pez cebra durante el estadio de 96 hpf expuestos al efluente secundario de la PTAR “Cerro de la Estrella”..	14
Figura 5: Representación del manejo del adaptador para teléfonos celulares en el ocular del estereoscopio.	19
Figura 6: Representación del estímulo mecánico con un capilar en la parte ventrolateral de una larva de 72 hpf.	20
Figura 7: Embriones de pez cebra de 24 hpf	23
Figura 8: Supervivencia de embriones de pez cebra a diferentes concentraciones de carbamazepina.....	23
Figura 9: Cambios en la tasa de eclosión en embriones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de CBZ.....	24
Figura 10: Cantidad de estímulos requeridos para la respuesta de escape en larvas expuestas a CBZ.	25
Figura 11: Porcentaje de larvas expuestas a CBZ que responden al primer estímulo mecánico	25
Figura 12: Clasificación del grado de motilidad en larvas expuestas a CBZ	27
Figura 13: Cambios en la motilidad de larvas expuestas a CBZ.	28
Figura 14: Cambios en el desplazamiento recorrido en larvas de pez cebra.	29
Figura 15: Cambios en el tipo de movimiento al efectuar el nado de larvas de 72 hpf	30
Figura 16: Cambios en el tipo de movimiento al efectuar el nado de larvas de 96 hpf	30
Figura 17: Vía de señalización neuronal provocado por un estímulo táctil	32
Figura 18: Diagrama de una larva de pez cebra a las 72 hpf que muestra la ubicación del ganglio trigémico, las neuronas Rohon Beard y las neuronas del ganglio de la raíz dorsal.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cuantificación de la carga de contaminantes orgánicos por unidad de proceso del tratamiento terciario de la PTAR Cerro de la Estrella. Los resultados muestran la persistencia de los contaminantes a lo largo del tren de tratamiento terciario.	13
---	----

RESUMEN:

Experimentos realizados previamente en colaboración con el Instituto de Ingeniería de la UNAM demostraron que la carbamazepina y otros microcontaminantes orgánicos no se eliminan durante el tren de tratamiento terciario de la Planta Tratadora de Aguas Residuales del Cerro de la Estrella; en consecuencia, una acumulación continua y gradual de estos microcontaminantes terminan en las aguas superficiales donde desembocan las aguas tratadas. En este sentido, estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación mostraron que la mezcla compleja de contaminantes hallados en la planta mencionada arriba, la afecta la supervivencia y la motilidad de embriones y larvas de pez cebra. Sin embargo, al ser una mezcla de contaminantes se desconoce el efecto individual de cada componente. En este estudio nos enfocamos en la carbamazepina debido a que es un contaminante comúnmente hallado en aguas superficiales a nivel mundial y ha sido reportado como un fármaco que puede tener efectos tóxicos en el comportamiento a concentraciones menores de la LC_{50} . Por ende, este proyecto se enfocó en evaluar el impacto que tiene la carbamazepina en la supervivencia y la motilidad pez cebra, un modelo experimental con múltiples ventajas para evaluar el desarrollo, efectos toxicológicos y efectos en el comportamiento. Los experimentos se realizaron con cantidades de carbamazepina halladas en muestras de agua tratada proveniente de la Plantas Tratadoras de Aguas Residuales “el Cerro de la Estrella” lo que nos permitió tener una visión más realista del efecto ambiental de este contaminante. Los resultados obtenidos mostraron que la supervivencia y la eclosión de embriones de pez cebra no se ve afectada en un rango de concentraciones 0.001-100 $\mu\text{g/L}$ de carbamazepina. Por otro lado, en este estudio se reporta una disminución en la respuesta de huida a un estímulo táctil en el estadio de 96 hpf de larvas expuestas a 100 $\mu\text{g/L}$. Finalmente, se observó una disminución en las distancias recorridas en el desplazamiento del nado conforme el tiempo de exposición a carbamazepina avanzó, lo que sugiere que las células involucradas en el proceso de huida podrían estar afectadas por un desbalance en la actividad neuronal provocado por la CBZ.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación del agua

La contaminación es un proceso que involucra la introducción de contaminantes (compuestos químicos sintéticos o naturales) al ambiente que pueden tener efectos perjudiciales para los ecosistemas (Hagen & Walls, 2005). La constante emisión de contaminantes ha superado la resiliencia de diversos ecosistemas para restablecer sus condiciones normales, en consecuencia, la sucesión frecuente de episodios de deterioro ambiental ha puesto en peligro la vida de la fauna silvestre y la sostenibilidad de las sociedades humanas (Rockström et al., 2009). En este sentido, el agua es un recurso vital para la supervivencia de todos los seres vivos; sin embargo, ha sido constantemente contaminado por distintos compuestos químicos provenientes de productos usados cotidianamente como: productos de higiene personal, fertilizantes, plásticos, etc. (Geissen et al., 2015); y de otras actividades antropogénicas como: la ganadería, la agricultura, la industria, la pesca, etc (Singh et al., 2020). El agua contaminada comúnmente termina en un drenaje que puede desembocar directamente en aguas superficiales (ríos o lagos), por lo que no puede entonces ser utilizada como agua potable (Singh et al., 2020). Se han implementado distintas medidas para mantener la calidad del agua tras su uso antropogénico (aguas residuales), entre estas se encuentra una serie de normas que dictan las características que el agua segura o de calidad debe tener para evitar desastres ecológicos y/o epidemiológicos, regulación propuesta en un convenio del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) donde se dio a conocer una lista de contaminantes catalogados como “prioritarios” ya que habían sido agentes causales de distintas enfermedades y tenían la característica de persistir a distintos procesos de degradación (Hagen & Walls, 2005).

De manera natural ocurren una sucesión de procesos naturales que conducen a la degradación de distintos contaminantes en el agua como: la biodegradación, la fotólisis, la hidrólisis, la adsorción y la lixiviación a través del suelo. Sin embargo, la degradación natural puede variar de días a años y la constante introducción de contaminantes a los cuerpos de agua puede provocar su acumulación (Durán-Álvarez et al., 2015). Una alternativa que surgió para regular y disminuir la contaminación del agua es el uso de distintas metodologías que han sido implementadas en un sistema de captación de aguas residuales llamado Plantas Tratadoras de Aguas Residuales (PTAR), las PTAR tienen la finalidad de acelerar el proceso de remoción de los contaminantes (Tiwari et al., 2017). A través del uso de una combinación de tratamientos (tren de tratamiento) para remover los contaminantes del agua de acuerdo a las regulaciones de cada país.

El tren de tratamiento de las PTAR consta de una serie de etapas que remueven contaminantes específicos: (1) la etapa primaria elimina los contaminantes sólidos suspendidos y coloidales, (2) la etapa secundaria tienen como objetivo

eliminar los desechos orgánicos o nutrientes a través de degradaciones biológicas y (3) los tratamientos en la etapa terciaria son especializados para la eliminación de los contaminantes catalogados como riesgosos para la salud humana y para el ecosistema (Rout et al., 2021). La combinación de diversos tratamientos ha vuelto exitoso el uso de las PTAR para disminuir las concentraciones de contaminantes en el agua, actuando como las principales barreras que frenan la contaminación provocada por actividades humanas (O'Flynn et al., 2021).

A pesar de que las PTAR son eficaces para remover una amplia lista de contaminantes se ha reportado que algunas metodologías convencionales (ej. lodos activados o UV) pueden cambiar la conformación estructural de algunos contaminantes generando una nueva molécula tóxica (Di Marcantonio et al., 2022). En este sentido, la combinación de diversos tratamientos ha resultado en ocasiones contraproducente debido a que algunos tratamientos pueden revertir los cambios conformacionales de un contaminante inactivo/degradado a su estado original (Tiwari et al., 2017), manteniendo las concentraciones del contaminante en el agua tratada. Adicionalmente, la introducción constante de nuevos compuestos químicos, disminuyen la eficiencia del tren de tratamiento de las PTAR, además se debe considerar que son compuestos diseñados para ser moléculas estables no son removidos por metodologías convencionales, lo que incrementa el costo de una PTAR al introducir metodologías nuevas y limita la producción de agua de calidad solo a los sectores que pueden financiarlo (O'Flynn et al., 2021).

Durante las últimas décadas, se han reportados contaminantes persistentes a las metodologías de las PTAR que se encuentran en bajas concentraciones, sin embargo, pueden tener un efecto potencial toxico para la fauna silvestre y la salud humana (John L. Wilkinson, 2022). Los contaminantes emergentes son sustancias químicas que recientemente han sido detectadas en el medio ambiente. No están reguladas por las leyes de protección ambiental porque su presencia y efectos fueron descubiertos hace poco. Aún se sabe poco sobre cómo afectan la salud humana y el ecosistema, lo que los convierte en una preocupación creciente (Geissen et al., 2015).

1.2 Contaminantes emergentes

Desde 1950 se han sintetizado más de 140,000 compuestos químicos, los 5000 compuestos que se producen en mayor volumen se han dispersado ampliamente en el medio ambiente (Gruber, 2018). Muy pocos productos comerciales de gran volumen de producción se han sometido a pruebas que regulen su toxicidad, la evaluación rigurosa previa a la comercialización se volvió obligatoria solo en la última década y solo en pocos países de altos ingresos, en consecuencia, los productos químicos que no fueron examinados previamente a su comercialización han sido repetidamente responsables de episodios de enfermedad, muerte y degradación ambiental (Landrigan et al., 2018).

Adicionalmente, las fallas en las regulaciones ambientales a menudo divergen entre países y agencias de seguridad ambiental, lo que se suma a que diversos

contaminantes que pueden ser potencialmente tóxicos se liberen al ambiente. En este sentido, distintos ríos y lagos terminan siendo afectados por una acumulación de contaminantes difíciles de degradar (Goldar & Banerjee, 2004) (Abanyie et al., 2020).

A menudo, los contaminantes difíciles de degradar son sustancias químicas sintéticas o naturales que no están incluidas en los programas de monitoreo de rutina internacional, por lo que su destino y sus efectos ecotoxicológicos a menudo se desconocen. La mayoría de estos al ser liberados continuamente al medio ambiente; a pesar de que en su mayoría se encuentran en cantidades muy bajas ($\mu\text{g-ng/L}$) (UNESCO, 2022) pueden acumularse y causar efectos negativos en la salud ecológica y humana (Geissen et al., 2015).

Debido a que distintos contaminantes emergentes (CE) son compuestos químicos con propiedades fisicoquímicas variadas se ha implementado una clasificación para su estudio: (1) sustancias orgánicas que pueden subdividirse en sustancias bioacumulables y tóxicas persistentes, como los contaminantes orgánicos persistentes (POPs, por sus siglas en inglés, Persistent Organic Pollutants) (2) compuestos inorgánicos (metales traza) y (3) contaminantes particulados como las nanopartículas y los microplásticos (Geissen et al., 2015). Interesantemente, los POPs han suscitado una gran preocupación a nivel mundial debido a su persistencia en el ecosistema, su posible biomagnificación y la bioacumulación en las cadenas tróficas (Miller & Orbock Miller, 2007). En este sentido, la contaminación por fármacos ha sido detectada a nivel mundial (John L. Wilkinson, 2022) e interesantemente han sido descritos como una clase relevante de POPs (Geissen et al., 2015).

Los fármacos son contaminantes que provienen principalmente de aguas residuales de desechos domésticos y hospitalarios (Rout et al., 2021). Asimismo, la contaminación por fármacos es causada por la síntesis de nuevos fármacos o los cambios en el uso de los que ya existen. Un ejemplo, ocurrió durante la pandemia provocada por el virus Sars Cov 2; un estudio donde se analizaron las concentraciones de diversos contaminantes provenientes del influente de dos PTAR en Italia (un país que fue muy afectado por las restricciones sanitarias) reportó una alteración en las concentraciones de distintos fármacos relacionados al tratamiento del COVID-19 (Di Marcantonio et al., 2022). Estos hallazgos llevaron a los autores a monitorear el efluente de las PTAR donde reportaron diversos fármacos que no eran comúnmente hallados a concentraciones altas (ej. paracetamol) y su degradación era mínima (ej. carbamazepina). En este sentido, cambios en el uso de fármacos ha generado una incertidumbre respecto a el impacto toxicológico que tendrán las distintas mezclas de contaminantes al ambiente, así como la incógnita respecto a si las PTAR serán lo suficientemente eficaces para remover nuevos contaminantes o contender con el incremento en su concentración (Geissen et al., 2015).

1.3 Carbamazepina como contaminante emergente

Los fármacos son moléculas diseñadas para interactuar con moléculas blanco con la finalidad de mejorar la homeostasis de un organismo, estos tienen que ser administrados al organismo y por ende ser metabolizados. Durante el metabolismo, un porcentaje del fármaco es desechado a través de orina y heces como la molécula original (sin metabolizar) y también sus metabolitos (Quadra et al., 2017). Bajo esta premisa, los fármacos más sus metabolitos pueden permanecer como compuestos farmacéuticos activos (APIs, por sus siglas en inglés Active Pharmaceutical Ingredient) al ser excretados y en función de su mecanismo de acción pueden ser un riesgo ecológico potencial (John L. Wilkinson, 2022).

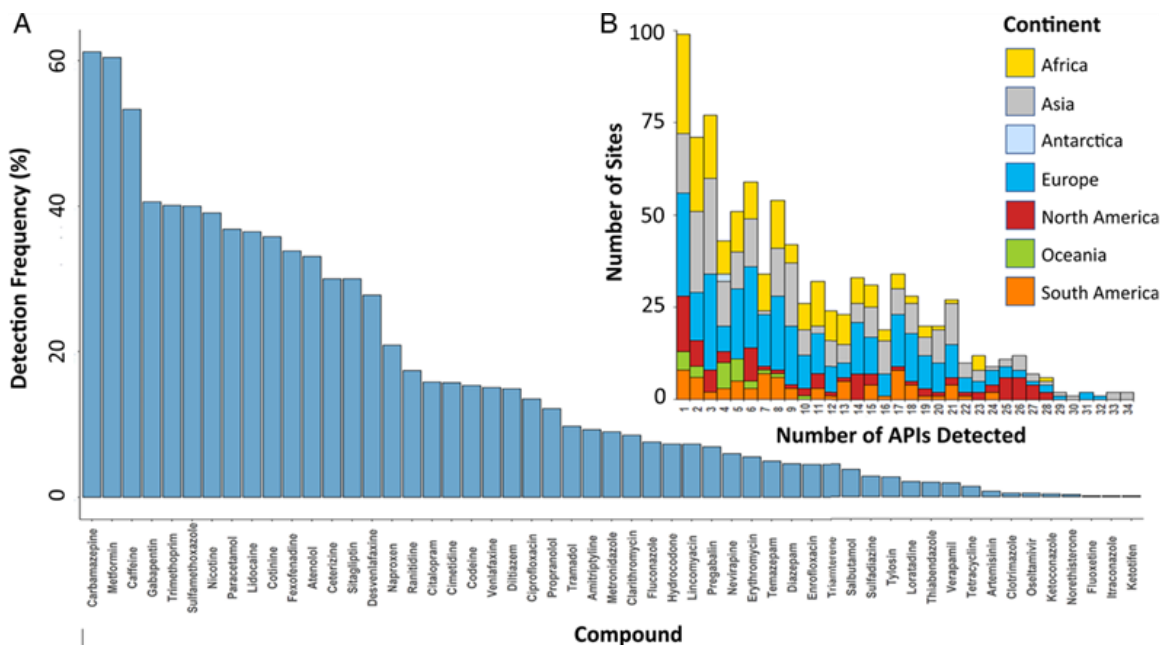


Figura 1: Frecuencias de detección de Ingredientes Farmacéuticos Activos (APIs) (John L. Wilkinson, 2022).

Un estudio reciente coordinado por el "Global Monitoring of Pharmaceuticals Project" ha reportado una lista de contaminantes farmacéuticos que permanecen como APIs en la mayoría de los ríos del mundo, donde se enlistan la carbamazepina, la metformina y la cafeína como los APIs más frecuentes en aguas superficiales (Fig.1). Interesantemente, un consorcio de investigación "EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters" (Loos et al., 2007) y la Red NORMAN (Décima et al., 2021), generó una base de datos que incluye 20 países con 25,359 muestras, encontrando una alta frecuencia de la presencia de carbamazepina (CBZ) como contaminante en aguas superficiales. Esta contaminación se relaciona con ser constante y recalcitrante a los tratamientos de aguas residuales que se mezclan con agua superficial (Loos et al., 2007). La degradación limitada en procesos naturales y su persistencia en el efluente de aguas tratadas ha sido reportada por diversos autores (Di Marcantonio et al., 2022; Durán-Álvarez et al., 2015; Zhang et al., 2008)

En un estudio realizado por Di Marcantonio y colaboradores(2020) analizaron el efluente de 76 PTAR en Italia durante 2.5 años, y reportaron una eficiencia de remoción muy baja para la CBZ (inferior al 50%), siendo las más bajas aquellas registradas en los tratamientos secundarios; asimismo, cuando se incluyeron también tratamientos primarios o terciarios la remoción de la CBZ no disminuyó significativamente (Di Marcantonio et al., 2020). El estudio realizado por Hai y col (2018) confirmó la limitada eliminación de la CBZ por el tratamiento secundario, independientemente de las metodologías usadas ya sean con lodos activados convencionales, biorreactor de membrana u otros. En México, la mayoría de PTAR solo cuentan con el tratamiento primario y secundario, se estima que el caudal tratado por estos tratamientos es de 75.2 l/s, que corresponde al 52% del caudal tratado a nivel nacional (CONAGUA, 2021). Lo que sugiere que contaminantes recalcitrantes como la CBZ podrían encontrarse a concentraciones ambientales altas. En México, la CBZ fue detectada en 2010 en aguas superficiales del Valle del Mezquital (donde casi todas las aguas residuales de la Ciudad de México desembocan), en concentraciones que variaron entre 84–240 ng/L (Gibson et al., 2010), un año después se detectó en aguas subterráneas con concentraciones de hasta 193 ng/L (Chávez et al., 2011), posteriormente en 2018 se reportó un máximo de 99.7 ng/L en el mismo sitio (Lesser et al., 2018). Mientras que un estudio realizado por Martínez Garay y Ramírez García en 2013 reportaron una cuantificación de 3,700-55,900 ng/L en el influente de un hospital en Toluca y >1000 – 5800 ng/L en el efluente de la PTAR de dicho lugar (Martínez Garay & Ramírez García, 2013)

En este contexto, es conocido que la conducta de distintos organismos puede ser sensible a la exposición de concentraciones más bajas que la LC_{50} de diversos contaminantes (es decir, la concentración a la que se espera que muera el 50% de la población expuesta). Lo que representa una amenaza para la biota expuesta ya que el comportamiento representa el vínculo entre un organismo y su entorno, por ende, puede tener consecuencias para la supervivencia del individuo y de la población; (Bertram et al., 2022).

La carbamazepina (CBZ) al ser un fármaco anticonvulsivo utilizado para un amplio espectro de enfermedades como: la neuralgia del trigémino, trastornos afectivos bipolares y depresión (Jacquin et al., 2020). Podría tener un efecto en el comportamiento de la fauna expuesta debido a que su mecanismo de acción se centra en el control de la hiperexcitabilidad de los potenciales de acción. Además la CBZ es un agonista del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un neurotransmisor inhibitorio, que promueve la regulación de la despolarización neuronal y participa en la regulación de la neurotransmisión de dopamina y glutamato, neurotransmisores asociados al comportamiento (Zhang et al., 2008);

Debido a que se sabe que la CBZ es un anticonvulsivo se sugiere que tendrá un efecto negativo en la motilidad y el evaluar el efecto en el desarrollo embrionario de pez cebra a concentraciones ambientalmente relevantes es necesario para señalar el posible efecto que puede repercutir en la fauna acuática.

1.4 Pez cebra como modelo experimental para el análisis de contaminantes del agua

El uso del modelo experimental *Danio rerio* (pez cebra) para el análisis de fármacos tiene múltiples ventajas, y ya se ha sido propuesto como un buen modelo de vertebrados para la detección de contaminantes, para el monitoreo ambiental, pruebas de toxicidad/teratogenicidad e investigaciones farmacológicas sobre los mecanismos de acción de distintos fármacos y los distintos fenotipos de enfermedades asociados con la exposición de distintos compuestos químicos (Bambino & Chu, 2017). Para fines de esta investigación, a continuación, se enlistan las virtudes que tiene el pez cebra como modelo experimental para analizar los contaminantes del agua:

- Es pequeño, su mantenimiento es accesible y se cría fácilmente en grandes cantidades: un solo desove produce entre 100 y 200 huevos (Kimmel et al., 1995).
- A pocos días de desarrollo, el embrión de pez cebra origina los distintos órganos y tejidos, como el cerebro, el corazón, el hígado, el páncreas, los músculos, etc. Se ha demostrado que estos órganos y tejidos son similares a los mamíferos a nivel anatómico, fisiológico y molecular (Kimmel et al., 1995).
- La administración de fármacos es sencilla a comparación de otros modelos experimentales (McGrath & Li, 2008).
- Los embriones del pez cebra son transparentes al principio del desarrollo embrionario permite la observación *in vivo* de especímenes vivos (Kimmel et al., 1995)
- Las larvas de pez cebra absorben pequeñas moléculas diluidas en el agua circundante a través de su piel y branquias por lo que solo requieren ser añadidas al medio (McGrath & Li, 2008).
- Los ensayos convencionales *in vitro* con células cultivadas pueden utilizarse para evaluar los efectos potenciales de la toxicidad de los fármacos, los resultados no suelen ser predictivos de los resultados *in vivo*, que implican la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos (McGrath & Li, 2008), lo que hace que los resultados de los estudios toxicológicos de los peces cebra sean a menudo relevantes para otros vertebrados (Qiang et al., 2016)
- La gran capacidad de análisis del comportamiento es también una característica de este modelo. Las respuestas conductuales del pez cebra son robustas, están conservadas evolutivamente y se asemejan a las de distintas especies de mamíferos (McGrath & Li, 2008).
- En el pez cebra, las evaluaciones conductuales pueden realizarse desde las 17 hpf y se dispone de tareas más complejas cuando los animales alcanzan un estado de natación libre y búsqueda activa de alimento en los 5 días posteriores a la fecundación (dpf) (Petersen et al., 2022). A medida que los peces se desarrollan, los comportamientos aumentan en complejidad. La mayoría de los estudios se centran en las fases larvarias

o adultas, y ya se han descrito unos 190 fenotipos de comportamiento distintos para el pez cebra (Kalueff et al., 2013).

Por lo que, el uso de embriones de pez cebra es adecuado para investigar la toxicidad del desarrollo y los cambios en el comportamiento larvario de la carbamazepina en concentraciones ambientalmente relevantes.

CAPÍTULO 2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Antecedentes

2.2 Cuantificación de contaminantes en la PTAR Cerro de la Estrella

Investigaciones previas realizadas en el Instituto de Biotecnología, UNAM en colaboración con el laboratorio de la Dra. Alma Chávez del Instituto de Ingeniería, UNAM; reportaron una baja eficiencia de remoción para el triclosán, bisfenol A, nonilfenoles y una remoción nula de CBZ a partir del efluente tratado de la PTAR “Cerro de la Estrella” ubicado en la delegación Iztapalapa, Ciudad de México (Ramirez, 2020).

La PTAR “Cerro de la Estrella” consta de un tren de tratamiento primario, secundario y terciario. En este sentido, las cuantificaciones fueron realizadas al inicio, durante y final del tratamiento terciario. Cabe resaltar que el inicio del tratamiento terciario es el efluente del tratamiento secundario y se reporta que desde ese momento la CBZ es el contaminante más concentrado, aunado a que se mantiene recalcitrante a todas las metodologías usadas a lo largo del tratamiento terciario (Tabla 1). Una limitante de este estudio es que solo se muestreo una vez, lo que no nos permite dilucidar la variabilidad entre concentraciones obtenidas a lo largo del tiempo y hacer una conclusión concreta de las concentraciones halladas en el estudio. Sin embargo, es contundente que la carbamazepina es un fármaco comúnmente persistente a las distintas metodologías usadas en las PTAR (Di Marcantonio et al., 2022); por lo que se utilizó en este trabajo un gradiente de concentraciones de carbamazepina para los experimentos en baso a los reportes de la PTAR del Cerro de la Estrella y otras PTAR.

UP	TCS		BPA		4 NF		NF		CBZ ²	Detección ¹
	Prom	Min- Max	Prom	Min- Max	Prom	Min- Max	Prom	Min- Max		
Influyente	2298	1239-3918	1675	1140-3083	0.309	0.192-0.394	353	-LD	44810	5
Prefiltración	1949	1622-2705	1431	1226-1544	0.322	0.239-0.427	440	-LD	30660	3
Posfiltración	2612	1720-3212	1761	1427-2083	0.4	0.266-0.582	223	-LD	45830	3
OI	1461	1276-1822	1335	913-2162	0.275	0.229-0.303	322	-LD	50270	3
Desinfección	1810	1539-2354	1755	1198-2282	0.281	0.171-0.0347	ND	-LD	89000	5
Rechazo	1949	1455-2377	1353	1039-2091	0.322	0.156-0.455	518	357-773	45220	5

1. Número de detecciones cromatográficas por cada UP.

Tabla 1: Cuantificación de la carga de contaminantes orgánicos por unidad de proceso del tratamiento terciario de la PTAR Cerro de la Estrella. Los resultados muestran la persistencia de los contaminantes a lo largo del tren de tratamiento terciario falta la cita aquí. ¿Qué son las abreviaturas?

2.3 Ensayo toxicológico del influente y efluente de la PTAR “Cerro de la Estrella”

Por otro lado, una investigación simultánea a la cuantificación de los contaminantes fue llevada a cabo usando las mismas muestras de agua tomadas a lo largo del tren de tratamiento terciario de la PTAR para hacer ensayos toxicológicos en embriones y larvas de pez cebra (Negrete, 2020). En este estudio, los embriones expuestos al agua tratada en el influente de la planta secundario desarrollaron distintas anomalías en su morfología durante su desarrollo como: edema pericárdico, edema vitelino, lordosis y escoliosis, observadas en mayor medida entre las 72 y 96 hpf (horas post fertilización). Asimismo, se reportó una disminución en la supervivencia de embriones y una alteración en el comportamiento motriz en embriones expuestos a las muestras del tren de tratamiento secundario. Sin embargo, hubo una notoria mejoría en el fenotipo de embriones y larvas expuestas entre el influente y el efluente (Fig.2). Interesantemente, las larvas expuestas al efluente terciario, a pesar de presentar un fenotipo normal reportaron cambios en la motilidad. Por otro lado, observaciones en las contracciones de embriones de 24 hpf expuestos al tratamiento terciario, reportaron un aumento en el movimiento a comparación del control (Negrete, 2020).

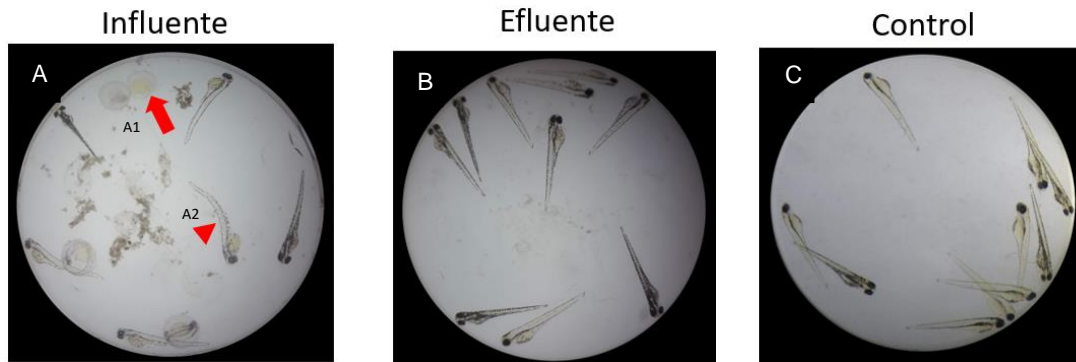


Figura 2: Ensayo toxicológico del tren de tratamiento secundario de la PTAR Cerro de la Estrella. Las fotografías muestran el ensayo toxicológico con peces cebra a las 72hrs, utilizando agua de distintos momentos del tren de tratamiento secundario. A) Se muestran los embriones expuestos al influente del tratamiento secundario, se observa un pez con retraso en el desarrollo embrionario (A1) y un pez con escoliosis (A2) (B) Efluente del tratamiento secundario (C) control. (Modificado de Negrete, 2020)

Se utilizaron técnicas que permitieran cuantificar el comportamiento natatorio, se reportó una disminución en la trayectoria de nado y un incremento en el número de larvas que no respondían a un estímulo táctil a las 72 y 96 hpf (Fig.3 y Fig.4 respectivamente) de exposición al influente y efluente terciario. Finalmente, se detectó un patrón de nado errático en larvas de 72 y 96 hpf expuestas tanto al influente como al efluente, efecto que podría estar relacionado a las altas concentraciones de CBZ (Negrete, 2020).

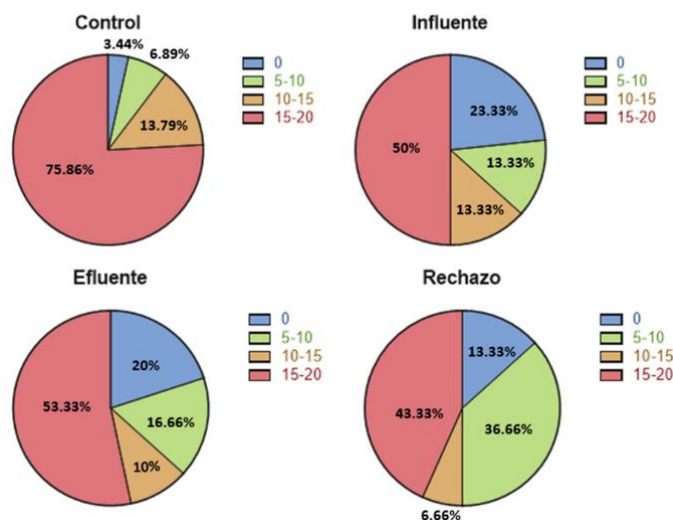


Figura 3: Distancias recorridas de larvas de pez cebra durante el estadio de 72 hpf expuestas al efluente secundario de la PTAR "Cerro de la Estrella". Las gráficas muestran el porcentaje de embriones que lograron llegar a las diferentes distancias (mm), en el control (n=29) y en el tren de tratamiento terciario influente (n=30), efluente (n=30) y membrana de rechazo (n=30).

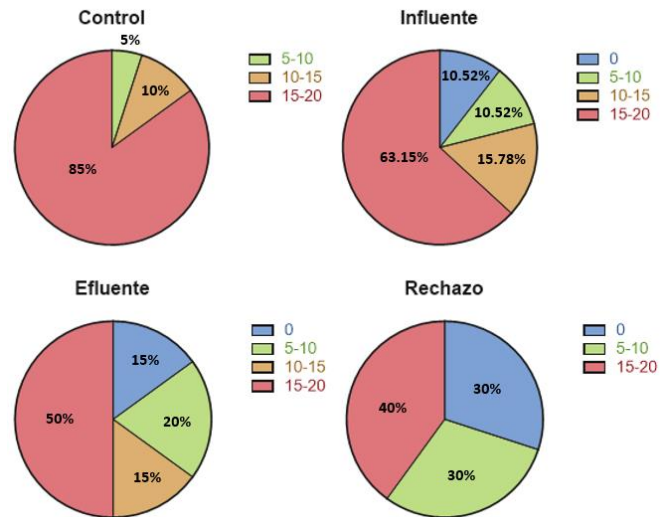


Figura 4: Distancias recorridas de larvas de pez cebra durante el estadio de 96 hpf expuestos al efluente secundario de la PTAR “Cerro de la Estrella”. Las gráficas muestran el porcentaje de embriones que lograron llegar a las diferentes distancias (mm) de los distintos tratamientos y el control. La gráfica nos muestra los porcentajes de distancia recorrida por los embriones, en el control (n=20) y en el tren de tratamiento terciario influente (n=19), efluente (n=20) y membrana de rechazo (n=20).

2.4 Efecto toxicológico de la CBZ usando el pez cebra como modelo experimental

Distintas investigaciones toxicológicas han utilizado al pez cebra como modelo experimental en sus distintas etapas de desarrollo (desde embriones a adultos) para evaluar el efecto de la CBZ. Los estudios han concluido que la CBZ tiene efectos en el comportamiento (Salahinejad et al., 2023), la respuesta de escape a distintos estímulos (Qiang et al., 2016). y la alteración en la expresión de distintos neurotransmisores que son blanco del mecanismo de acción del fármaco (Chen et al., 2020).

Investigaciones previas en el pez cebra adulto expuesto a dos concentraciones distintas de CBZ en el agua (10 y 10,000 µg/L) durante 63 días muestra una alteración en el comportamiento de alimentación debido a un aumento en el tiempo de ingesta total en ambas concentraciones (da Silva Santos et al., 2018). Otro estudio en peces adultos expuestos a CBZ, describe una alteración en el comportamiento del pez cebra, al preferir estar en la oscuridad (un comportamiento de la ansiedad común) (Salahinejad et al., 2023).

Estudios realizados en embriones y larvas han tomado distintos criterios y metodologías para evaluar el comportamiento de acuerdo a esta etapa de desarrollo. Bajo esta premisa, distintas metodologías se han implementado para evaluar el comportamiento del embriones y larvas. En embriones, generalmente es evaluado el número de contracciones para evaluar su desarrollo y eficiencia de eclosión, por otro lado, en larvas distintos ensayos de motilidad son realizados para evaluar su natación y respuesta de escape, cualidades esenciales para su supervivencia. Se ha descrito que larvas expuestas a un rango de 1-5 µg/L de

CBZ reportan una respuesta de escape más rápida que es directamente proporcional a la concentración de CBZ (Qiang et al., 2016). Sin embargo, otro estudio señala que la respuesta de escape disminuye a concentraciones elevadas de 42,000 µg/L de CBZ (Chen et al., 2020).

Por otro lado, se han estudiado las concentraciones máximas a las que embriones y larvas de pez cebra pueden sobrevivir y desarrollarse de manera normal. La concentración letal del 50 % (LC₅₀) de CBZ en embriones de pez cebra es de 245 mg/L, y se observó tanto el retraso de la eclosión como el retraso del crecimiento en el 100% de las larvas expuestas a una concentración de carbamazepina superior a 122 mg/L (van den Brandhof & Montforts, 2010). Mientras que concentraciones de 56,7 y 113,4 mg/L de CBZ inducen un retraso en la eclosión (50 y 100 %, respectivamente) (Beker van Woudenberg et al., 2014). Sin embargo, estas concentraciones estudiadas son mucho más elevadas que las que se registran actualmente en aguas superficiales y aguas tratadas (John L. Wilkinson, 2022) (Ramirez, 2020). En un estudio que utilizó concentraciones ambientalmente relevantes (1,10 y 100 µg/L) no se observaron cambios significativos en la tasa de eclosión, la frecuencia cardíaca o la longitud corporal, pero sí se observó una disminución en la cantidad de movimientos tempranos a las 24 hpf, asimismo un incremento en la actividad de distintos neurotransmisores como la acetilcolina y GABA en concentraciones de 10 y 100 µg/L de CBZ y una disminución de glutamato en 1 y 100 µg/L (Chen et al., 2020). Sin embargo, los estudios realizados por Chen et al., 2020 no se llevaron a cabo largo del desarrollo embrionario.

Las muestras obtenidas de la planta terciaria pueden contener una diversidad de CE como se ha demostrado en otros trabajos previos (Ramirez, 2020). Con la finalidad de evaluar si la CBZ es responsable en cierta medida a la falta de motilidad observada al tratar a los embriones con las muestras de la PTAR del Cerro de la Estrella se decidió probar a la CBZ de manera individual a las concentraciones observadas en la planta de tratamiento.

En este trabajo utilizaremos distintas concentraciones de CBZ acorde a las halladas en el agua tratada y se evaluarán embriones de pez cebra a lo largo de los primeros días del desarrollo embrionario; con metodologías que permitan dilucidar la letalidad y un efecto en la motilidad. Desconocemos si las concentraciones encontradas a lo largo del tren de tratamiento siguen siendo tóxicas o no; de esta manera podríamos determinar si el tratamiento de agua por las PTAR es suficiente para eliminar parcialmente un efecto toxicológico y poder garantizar el uso de agua renovada y su potencial reusó para recargar acuíferos explotados por la gran demanda antropogénica.

2.5 Justificación

- Estudios previos en el laboratorio demostraron que la exposición de agua tratada proveniente de la PTAR “Cerro de la Estrella” modificó la motilidad de larvas de pez cebra de 96 hpf. Posteriormente, se demostró que el agua tratada contenía una mezcla compleja de contaminantes persistentes al tren de tratamiento de la PTAR donde la carbamazepina fue el contaminante más concentrado en el agua tratada. En este sentido, la carbamazepina es un fármaco principalmente para tratar epilepsias y algunas enfermedades mentales. Estudios previos han relacionado la exposición de distintas concentraciones de carbamazepina con alteraciones en el comportamiento y cambios en la motilidad de distintas especies de peces. Interesantemente, la carbamazepina ha sido reportada como el producto farmacéutico hallado con mayor frecuencia en aguas superficiales a nivel mundial. Su persistencia a distintos tipos de tratamiento empleados en las PTAR y a distintos mecanismos de degradación la han catalogado como un posible riesgo para la biota acuática y la salud humana
- Diversos autores, han descrito a los embriones y larvas de pez cebra como biosensores confiables para evaluar la toxicidad de diversos fármacos. Sus características distinguibles durante el desarrollo como la transparencia y un desarrollo fuera del útero los vuelven un buen modelo para evaluar los posibles efectos tóxicos de la carbamazepina. Adicionalmente, el comportamiento de embriones y larvas del pez cebra ha sido ampliamente caracterizado, lo que garantiza un buen modelo para evaluar los posibles efectos en la motilidad del pez cebra provocados por los efectos de la carbamazepina.

2.6 Hipótesis

La carbamazepina a las concentraciones observadas en la PTAR afectará la motilidad en larvas del pez cebra

2.7 Objetivo general

Evaluar los efectos de la carbamazepina en el desarrollo embrionario del pez cebra

2.8 Objetivos específicos

Evaluar la supervivencia y viabilidad de los embriones y larvas expuestas a la curva de concentraciones de carbamazepina halladas en las PTAR hasta las 96 hpf.

Evaluar la motilidad del pez cebra al exponerlas a las concentraciones de carbamazepina encontradas en la PTAR.

CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA

3.1 Cría del pez cebra y recolección de embriones modificado de (ZFIN: Zebrafish Book: Contents, 2000)

Para este estudio, se usaron peces cebra adultos de la línea WT establecida en el acuario local del laboratorio. Los peces cebra adultos se mantuvieron a 26 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 14:10 horas. Los peces fueron alimentados dos veces al día con comida seca y dos veces con artemia; las condiciones del agua se monitorearon diariamente manteniendo un pH de 7-7.6, a una temperatura de 25 - 28°C y una conductividad entre 900-1200 Us, con una densidad de 25 peces por pecera.

Para la cruce, se colocaron peces cebra macho y hembra en una proporción de 1:2 en un tanque limpio. El pez cebra suele desovar momentos después del periodo de oscuridad de 10 horas. Los embriones se recogieron entre los 40 – 60 minutos después de que la luz se encendiera, los embriones se agruparon y se lavaron varias veces con agua de acuario (agua desionizada por osmosis inversa mezclada con sales: NaHCO₃ 4.2 gr, sales Instant Ocean 3 gr y 3 gotas de azul de metileno en 80 L con agua de osmosis inversa) antes de ser colocados en el medio de cultivo embrionario que consiste en 2gr de sales Instant Ocean® en 50 ml de H₂O, diluido en 1 litro de H₂O desionizada.

3.2 Prueba toxicológica

La prueba toxicológica se basó en el ensayo “Embryo toxicity tests with the zebrafish (*Danio rerio*)” propuesto por Braunbeck & Lammer, 2007.

Los embriones se examinaron con un microscopio de disección (Carl Zeiss™ 455052-0000-000 Stemi 2000-C) a las 4 hpf debido a que a partir de este momento el desarrollo ocurre independientemente de la herencia materna y las alteraciones en el desarrollo a partir de este momento pueden ser causadas por el fármaco en mayor probabilidad. Posteriormente se transfirieron los embriones sanos a placas de cultivo de 48 pocillos (placa multipocillo de cultivo celular, 48 pocillos, transparente, Cellstar®).

Para el stock de carbamazepina se usó agua miliQ como solvente, se preparó diluyendo 0.1 mg de CBZ en 100 ml de agua para tener una concentración final de 1000 µg/L, esta se guardó en alícuotas de 500 µL a 4°C.

Para realizar la curva de concentraciones de CBZ, se sacó una alícuota del congelador tiempo antes de su uso, una vez descongelada se agitó brevemente en el vórtex y se trasladaron 100 µL a un tubo de 1.5 ml con 900 µL de medio de embrión, de manera que la concentración final fuera 100,000 ng/L, se homogenizó con ayuda del vortex y a partir de 100,000 ng/L se hizo una dilución seriada 1:10 hasta 1 ng/L. Las concentraciones finales utilizadas fueron 1, 10, 100, 1000, 10000 y 100000 ng/L.

Se verificaron varios parámetros para evaluar alteraciones durante el desarrollo embrionario: edemas pericárdicos, malformación, muertes y retrasos en el

desarrollo, adicionalmente se evaluó el comportamiento natatorio tras la exposición de larvas de 72 y 96 hpf a los tratamientos con carbamazepina. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada concentración, y cada réplica contenía 10 embriones. Las cajas multi pozos se mantuvieron en una cámara húmeda para evitar la evaporación del agua a $28 \pm 0,5$ °C en la incubadora. Todas las pruebas toxicológicas se llevaron a cabo a partir de las 4 hpf.

3.3 Ensayo de comportamiento natatorio (modificado de Goody et al, 2013)



Figura 5: Representación del manejo del adaptador para teléfonos celulares en el ocular del estereoscopio

El ensayo de Goody & Henry, 2013 permite analizar la capacidad de natación de larvas de pez cebra a partir de las 72 hpf, resulta en una técnica útil para estudiar la función neuromuscular determinando el tiempo que tardan los embriones de pez cebra en nadar una distancia predeterminada y la respuesta al toque a través de análisis de videos. En este ensayo se modifican algunos aspectos paramétricos del ensayo original que permiten conservar la medición del comportamiento de huida (respuesta al estímulo táctil) y la distancia recorrida por estímulo recibido el cual es denominado “Ensayo modificado de Goody & Henry, 2013. El ensayo consistió en colocar un adaptador para celulares en el ocular del estereoscopio de manera que el lente de la cámara del celular tuviera un campo de visión extenso y claro (Fig.5).

Posteriormente, se transfirieron respectivamente larvas de 72, 96 y 120 hpf de la caja de cultivo de 48 pozos (la prueba toxicológica) a una caja Petri de 60 mm con 10 ml de medio de embrión sin CBZ, la caja Petri se mantuvo en la platina del estereoscopio. Las larvas fueron transferidas al centro del campo de visión comenzando siempre con el control y en forma ascendente respecto a las concentraciones analizadas (1, 10, 100, 1000, 10000, 100000 ng/L). Para la capacidad natatoria, las larvas fueron estimuladas de manera táctil con una un capilar (el cual fue calentado para formar una especie de aguja con la punta roma) cerca de las somitas (parte dorsal) debido a la presencia de células efectoras a la respuesta de escape en esa zona (Fig. 6). Se mantuvo precaución

de que el toque fuera suave y en lapsos de 30 segundos para evitar la habituación, en este sentido, se consideraron 10 toques como límite para la prueba. Para cada larva, las veces de estímulos fueron registradas en una bitácora. Las larvas que presentaban mucha actividad se transfirieron a una caja Petri de 6 mm y se mantuvieron en reposo entre 1 a 5 minutos para su adaptación al cambio de ambiente. El ensayo se realizó en el rango de tiempo en que las larvas presentan mayor actividad: 8:30 am - 3:00 pm. El agua de embrión se mantuvo a temperatura ambiente y los embriones fueron aclimatados 30 minutos antes de comenzar.

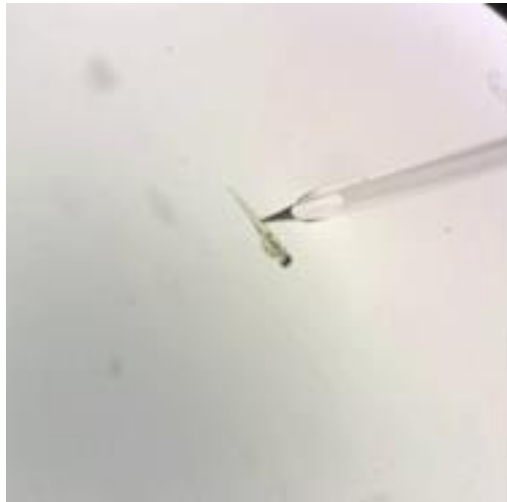


Figura 6: Representación del estímulo mecánico con un capilar en la parte ventrolateral de una larva de 72 hpf.

3.4 Adquisición de vídeo:

Los videos se grabaron con una configuración de video de 1080 píxeles a 30 cuadros por segundo. Se configuró la cámara de video de manera que se añadiera una cuadrícula en la imagen para ajustar a las larvas en el centro del campo de visión. Se comenzó la grabación cuando la larva estaba inmóvil y en el centro; la larva fue estimulada mecánicamente con una pipeta Pasteur con un límite de 10 estímulos para observar la respuesta de escape. Si la larva una vez centrada se movió lejos del centro sin ningún estímulo táctil, se movió la caja Petri ligeramente sin generar ondas en la superficie del agua hasta volver a ajustar la larva en el centro con respecto a la cámara, para el caso de las larvas que se desajustaron y nadaron hasta la orilla de la caja Petri, se usó la pipeta de transferencia para volver a colocarlos en el centro. Las larvas que permanecían en constante movimiento y no se ajustaban fácilmente se mantuvieron en la pipeta de transferencia entre 1 y 5 min hasta que permanecieran en un estado de reposo o se colocaron en una caja Petri con agua de embrión para su posterior análisis con 3 intentos máximos para que permanecieran en el centro, estas larvas no se estimularon con el capilar hasta que permanecieron en estado de reposo.

Para detener la grabación se consideró que la larva saliera completamente del campo de visión en el primer impulso de escape; sin embargo, hubo ocasiones en las que las larvas nadaron distancias cortas, continuas y pausadas por lo que

se detuvo la grabación en la primera pausa durante el nado, se consideró que la primera pausa durara aproximadamente 1 segundo. Se repitieron estos pasos hasta que los vídeos de todas las larvas fueran grabados. No se reajustó la configuración del estereoscopio, ni de la cámara dentro de un experimento de ensayo de motilidad.

3.5 Análisis de vídeos:

Los videos fueron recortados en tiempo con la finalidad de eliminar el tiempo que las larvas se encontraban sin actividad de manera que solo quedara la respuesta de escape y la trayectoria recorrida hasta que las larvas salieron del campo de visión o hasta que se detuvieron más de un segundo. En una hoja de cálculo se registraron los valores obtenidos de las clasificaciones siguientes:

- *Análisis de motilidad:* En el análisis se tomó en cuenta la capacidad de las larvas para moverse. Por tanto, se llevó a cabo un registro de todas aquellas larvas que se movieron y no se movieron. En el análisis se consideró el número total de larvas con movimiento y se comparó con el número total de larvas sin movimiento de manera que se obtuvo un porcentaje que expresara todas aquellas larvas con movimiento en cada concentración (% de motilidad).
- *Análisis de desplazamiento máximo:* En este análisis se tomó en cuenta la capacidad de larvas para recorrer una distancia máxima. Se considero distancia máxima como la capacidad de las larvas para huir y salir del campo de visión una vez fue llevado a cabo el estímulo táctil. Por tanto, se consideraron todas las larvas que tuvieron movimiento como el total de la muestra y se comparó con las larvas que nadaron fuera del campo de visión, para obtener el porcentaje de larvas que nadaron una distancia máxima (% de desplazamiento máximo).
- *Análisis de movimiento errático:* En este análisis se cuantificó número de larvas con nado errático, se consideró como muestra total a todas las larvas que tuvieron un desplazamiento máximo (que lograron salir del campo de visión) y se comparó con el número total de larvas con movimiento errático para obtener el porcentaje de movimiento errático.

3.6 Estadística:

Para evaluar la supervivencia se realizó un análisis de supervivencia y eclosión utilizando curvas de Kaplan-Meier en el software GraphPad Prism. Los datos de supervivencia, que incluían el tiempo hasta la muerte de cada larva y el estado del evento (muerto o censurado), se ingresaron en Prism. Se generaron curvas de Kaplan-Meier para cada grupo de concentración de CBZ. La comparación de las curvas de supervivencia entre los diferentes grupos se llevó a cabo utilizando la prueba de Log-rank (Mantel-Cox).

Para determinar si la mediana y el rango de estímulos, motilidad, desplazamiento y movimiento errático eran distintos en comparación con los grupos control, se efectuó un análisis Kruskal Wallis con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Los p valores fueron corregidos con el ajuste de Bonferroni. Aquellos grupos entre los

cuales $p < 0.05$ se consideraron diferentes debido a que los datos usados en este estudio son no paramétricos. Aquellos grupos entre los cuales $p < 0.05$ se consideraron diferentes debido a que los datos usados en este estudio son no paramétricos. Adicionalmente, se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes, comparando la media de la supervivencia entre las dos concentraciones. Este análisis se aplicó únicamente a las muestras con dos réplicas.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS

4.1 Supervivencia de larvas de pez cebra expuestas a concentraciones de CBZ

Este experimento consistió en la exposición de embriones y larvas de pez cebra a distintas concentraciones de CBZ. Estas concentraciones fueron seleccionadas de acuerdo con el rango de concentraciones halladas en la PTAR “Cerro de la Estrella” y otras plantas de tratamiento del país con el objetivo de ver el efecto toxicológico de la CBZ en la supervivencia de embriones y larvas a concentraciones ambientalmente relevantes. El ensayo toxicológico comenzó a partir de las 4 hpf durante el estadio de esfera, los embriones fueron monitoreados cada 24 horas hasta llegar a las 96 hpf (4 días) donde se cuantificó el número de larvas vivas y muertas durante los 4 días de exposición. Se distinguió a un embrión muerto por la observación de un aglomerado de color oscuro y un corion irregular (Fig. 7). Los resultados obtenidos señalan que durante el tiempo de exposición los controles sobreviven un 95%, mientras que las larvas expuestas a 1, 100, 1000, 10000 ng/L presentaron valores similares al control (~95%) hasta las 96 hpf (Fig.8). Las larvas expuestas a 10 y 100000 ng/L presentaron un rango entre 87-91% de supervivencia, diferencia que a comparación del control no es significativa.

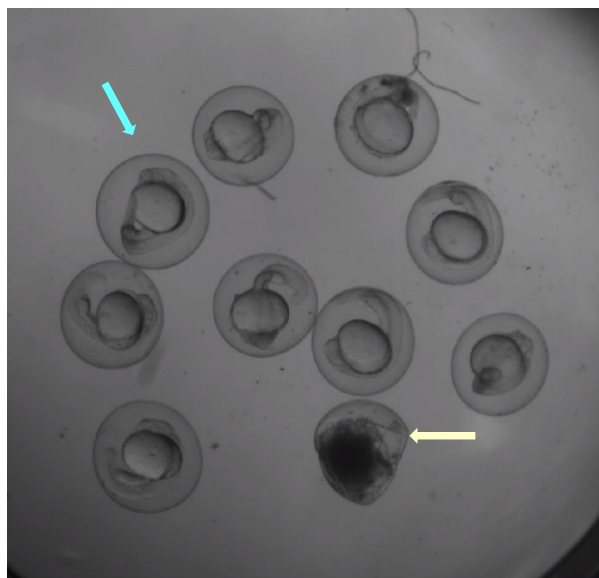


Figura 7: Embriones de pez cebra de 24 hpf. La flecha azul señala a un embrión vivo y la flecha amarilla señala un embrión muerto

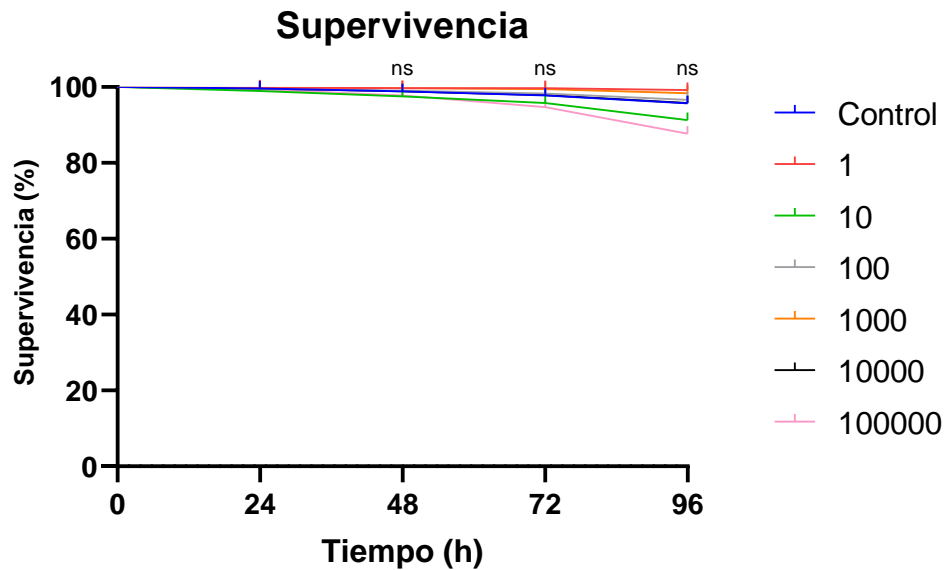


Figura 8: Supervivencia de embriones de pez cebra a diferentes concentraciones de carbamazepina. Control (n=471), 1 ng/L (n=470), 10 ng/L (n=457), 100 ng/L (n=476), 1000 ng/L (n=471), 10000 ng/L (n=455), 100000 ng/L (n=465) (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.001 y ns: no significativo).

Por otro lado, la eclosión es un proceso en el cual los embriones de pez cebra salen del corion, este es un parámetro utilizado para evaluar retrasos durante el desarrollo. Por tanto, se cuantificó la eclosión a partir de las 48 hpf, como reportó Kimmel et al., 1995, donde se describe que la eclosión comienza a partir de las 48 a 96 hpf. En este estudio se observó que la mayoría de los embriones eclosionan durante las 48 hpf (Fig.9), y que la tasa de eclosión no es afectada significativamente por las distintas concentraciones de CBZ.

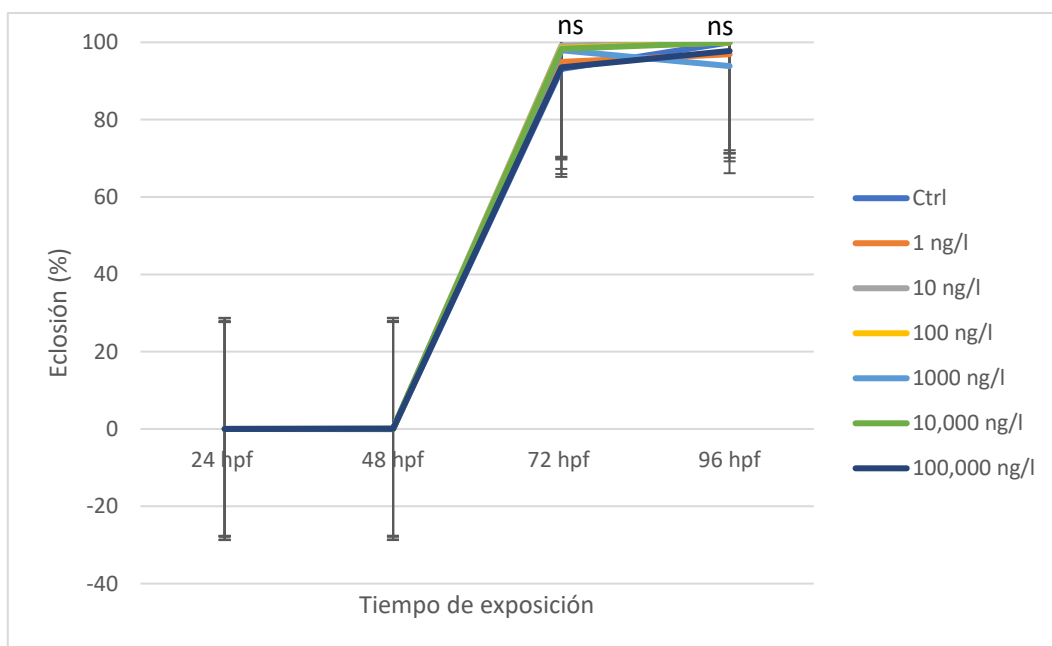


Figura 9: Cambios en la tasa de eclosión en embriones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de CBZ. Control (n=471), 1 ng/L (n=470), 10 ng/L (n=457), 100 ng/L (n=476), 1000 ng/L (n=471), 10000 ng/L (n=455), 100000 ng/L (n=465). (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.001 y ns: no significativo).

4.2 Cambios en la sensibilidad a estímulos mecánico-táctiles

La respuesta inducida por un estímulo táctil nos indica la capacidad de sobrevivencia, asimismo nos puede sugerir si existe un daño neuro-muscular en la respuesta a través del análisis de la respuesta a escape (Goody et al, 2013). Por tanto, en este estudio se evaluó el número de estímulos táctiles necesarios para que se presentara la respuesta de escape en larvas de pez cebra (72–96hpf) tratados con CBZ. En el ensayo se estableció un límite máximo de 10 estímulos para definir si una larva se movía o no y durante el experimento se consideró un minuto entre cada estímulo. Se detuvo el ensayo cuando ocurrió una respuesta de escape al estímulo o se cumplió el límite de estímulos.

Las primeras veces que se realizó este ensayo, se estimuló de manera indistinta con un pincel o con la punta de un capilar, asimismo se estimulaba en la cabeza o en la parte final de la cola de la larva. Sin embargo, nos percatamos que los resultados se afectaban por estas variables y decidimos no tomar en cuenta esos experimentos y solo considerar los parámetros descritos en la Metodología.

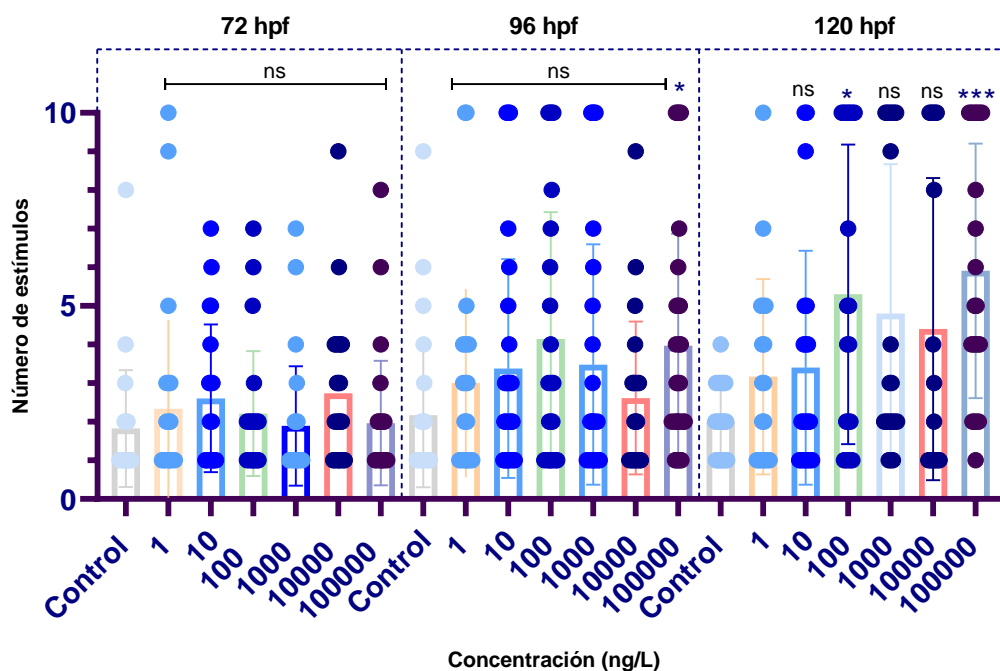


Fig.10 Cantidad de estímulos requeridos para la respuesta de escape en larvas expuestas a CBZ. 72 hpf: Control (n=29), 1 ng/L (n=27), 10 ng/L (n=28), 100 ng/L (n=28), 1000 ng/L (n=28), 10000 ng/L (n=30), 100000 ng/L (n=29), 96 hpf: Control (n=30), 1 ng/L (n=27), 10 ng/L (n=29), 100 ng/L (n=28), 1000 ng/L (n=29), 10000 ng/L (n=26), 100000 ng/L (n=31), 120 hpf: Control (n=22), 1 ng/L (n=18), 10 ng/L (n=20), 100 ng/L (n=20), 1000 ng/L (n=20), 10000 ng/L (n=20), 100000 ng/L (n=22). (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.001 y ns: no significativo).

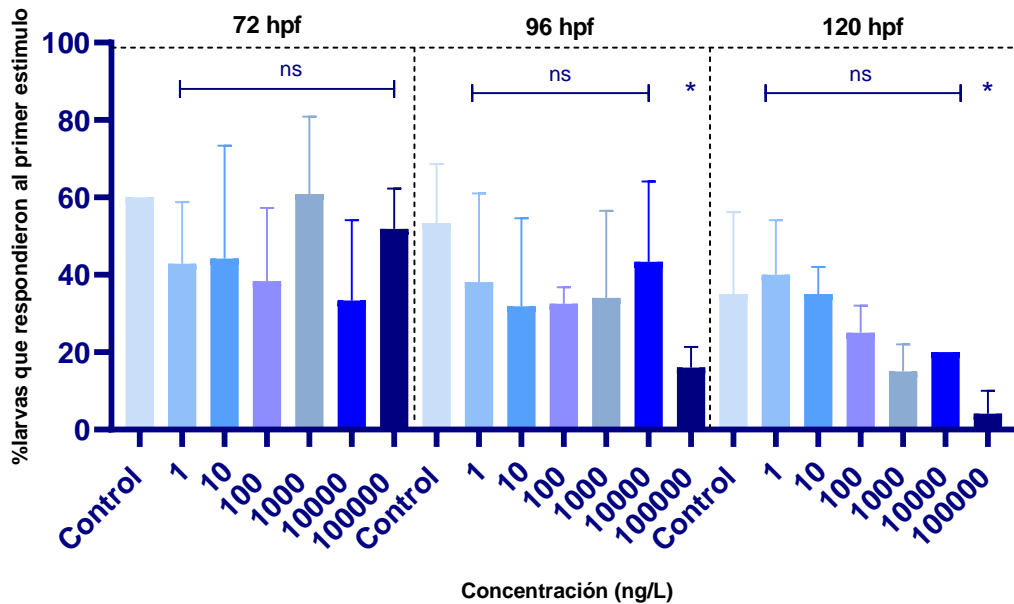


Figura 11: Porcentaje de larvas expuestas a CBZ que responden al primer estímulo mecánico. 72 hpf: Control (n=29), 1 ng/L (n=27), 10 ng/L (n=28), 100 ng/L (n=28), 1000 ng/L (n=28), 10000 ng/L (n=30), 100000 ng/L (n=29), 96 hpf: Control (n=30), 1 ng/L (n=27), 10 ng/L (n=29), 100 ng/L (n=28), 1000 ng/L (n=29), 10000 ng/L (n=26), 100000 ng/L (n=31), 120 hpf: Control (n=22), 1 ng/L (n=18), 10 ng/L (n=20), 100 ng/L (n=20), 1000 ng/L (n=20), 10000 ng/L (n=20), 100000 ng/L (n=22). (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.001 y ns: no significativo).

Los resultados mostraron que la CBZ a una concentración de 100,000 ng/L disminuye la respuesta de escape durante 96 y 120 hpf (Fig.10). El incremento en el número de estímulos requeridos para que las larvas se movieran tendió a ser gradual conforme el periodo de exposición avanzó (Fig.10). En ese sentido, de las larvas analizadas, el 78% se movió en el primer estímulo mecánico a las 72 hpf, sin ningún efecto estadísticamente significativo (Fig.11). Durante las 96 hpf, el porcentaje de larvas que respondió al primer estímulo disminuyó a 53%, las larvas a una concentración de 100,000 ng/L de CBZ fueron las más afectadas con un 16% de individuos que escaparon en el primer intento (Fig.11). Por otro lado, los ensayos toxicológicos realizados a las 120 hpf son estudios preliminares y hacen falta más repeticiones para tener conclusiones más concretas. Bajo esa premisa, observamos un incremento en el número de estímulos a comparación de las 96 hpf. Las larvas que respondieron al primer toque disminuyeron a 27% y un remarcable efecto se observó en las larvas expuestas a 100,000 ng/L donde solo el 4% logro escapar al primer estímulo (Fig.11).

4.3 Clasificación de los patrones de nado en larvas de pez cebra

Durante la respuesta de escape obtenida por los estímulos táctiles se observó que los patrones de desplazamiento al nadar cambiaban en las distintas concentraciones de CBZ. Por lo que en este estudio definimos criterios para clasificar los distintos tipos de nado en relación en como las larvas se desplazaban después del estímulo táctil. Bajo esta premisa, el nado se clasificó

de la siguiente manera: (1) movimiento recto: ocurrió cuando las larvas nadaron en una dirección recta y salieron del campo de visión (Fig. 12-A), (2) movimiento en círculos: larvas que nadaron sin direccionalidad (nado tipo remolino) (Fig. 12-B), (3) poco movimiento: larvas que tras ser estimuladas presentaron un desplazamiento corto y no salieron del campo de visión (Fig. 12-C), (4) sin movimiento: larvas que no presentaron ningún tipo de desplazamiento (Fig. 12-D). Esta clasificación nos permitió analizar la diferencia que existe en el patrón de desplazamiento de cada larva entre el control y cada tratamiento con CBZ.

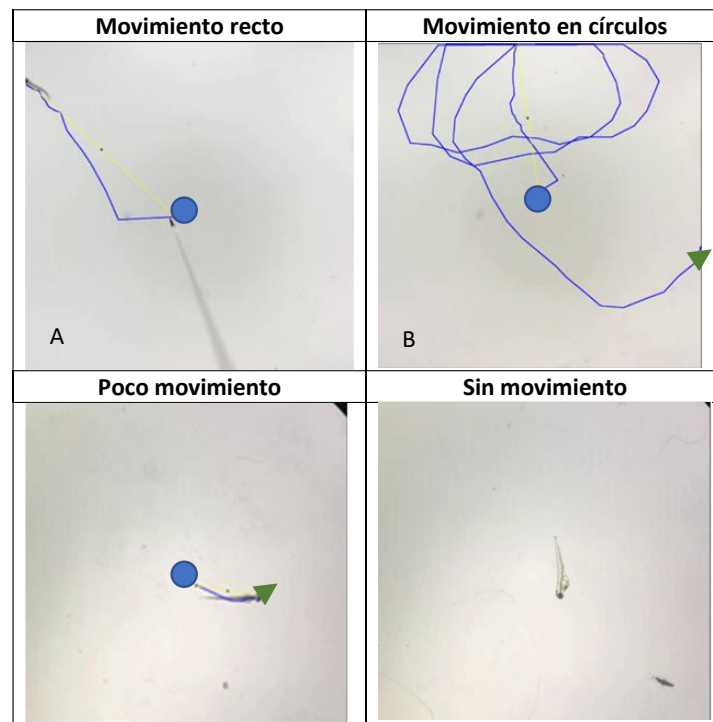


Figura 12: Clasificación del grado de motilidad en larvas expuestas a CBZ. El círculo azul representa el punto inicial en el que la larva respondió al estímulo y el triángulo verde representa el punto final de su trayectoria.

4.4 Análisis de motilidad

Con relación a la clasificación de los distintos patrones de nado de larvas de pez cebra, se cuantificó inicialmente el número de larvas que tuvieron desplazamiento (independiente de la distancia) comparado con las larvas sin movimiento, con la finalidad de evaluar el número de larvas que lograron moverse (% de motilidad). El análisis señala que el 87.44 % del número total de larvas analizadas lograron desplazarse ante un estímulo táctil durante el ensayo toxicológico. Durante los primeros 3 días de exposición al CBZ, las larvas de 72 hpf no disminuyen su motilidad, lo que indica que durante este periodo de exposición la CBZ no tuvo un efecto significativo en la motilidad de las larvas y la mayoría lograron desplazarse (Fig. 13). Sin embargo, a las 96 hpf la motilidad se reduce entre las larvas tratadas (Fig. 13), sin embargo, los cambios no son estadísticamente significativos. Posteriormente se hicieron experimentos preliminares para evaluar si el efecto de la CBZ en la motilidad se incrementa en dependencia al tiempo de exposición, por lo que se usaron larvas de 120 hpf para el ensayo de comportamiento natatorio donde se mantuvo una tendencia a

la disminución del movimiento conforme las concentraciones de CBZ aumentaron (Fig.13), sin embargo, son necesarias más réplicas para poder tener conclusiones robustas.

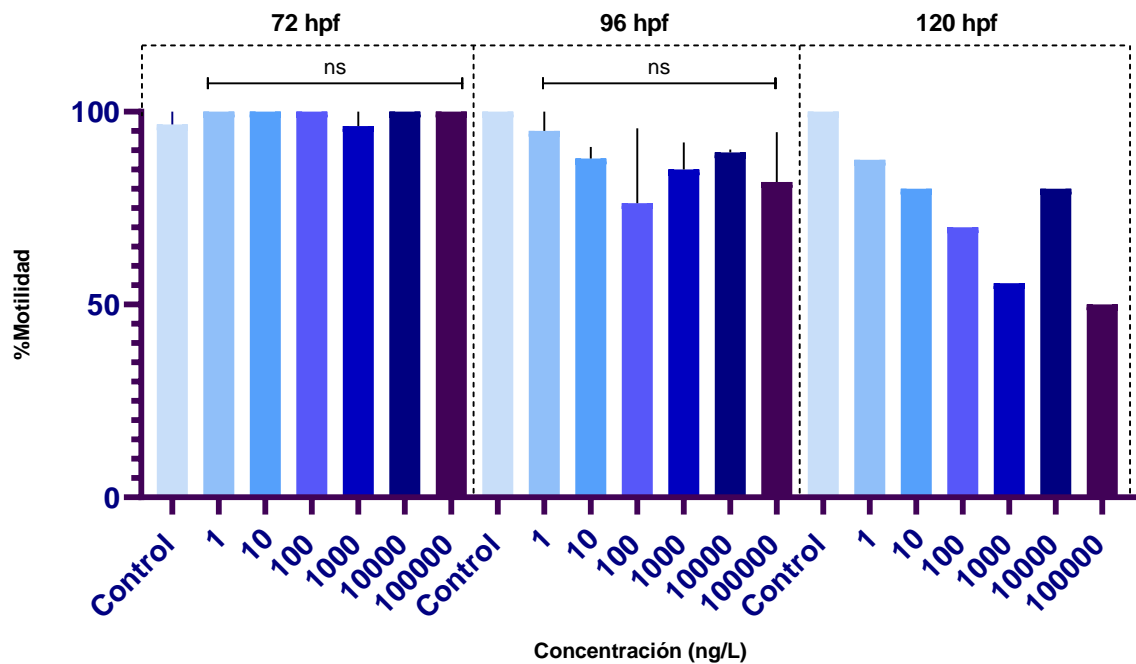


Figura 13: Cambios en la motilidad de larvas expuestas a CBZ. 72 hpf: Control (n=23), 1 ng/L (n=22), 10 ng/L (n=23), 100 ng/L (n=23), 1000 ng/L (n=24), 10000 ng/L (n=24), 100000 ng/L (n=24). 96 hpf: Control (n=20), 1 ng/L (n=18), 10 ng/L (n=17), 100 ng/L (n=18), 1000 ng/L (n=20), 10000 ng/L (n=19), 100000 ng/L (n=22). 120 hpf: Control (n=10), 1 ng/L (n=8), 10 ng/L (n=10), 100 ng/L (n=10), 1000 ng/L (n=9), 10000 ng/L (n=10) (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.001 y ns: no significativo).

4.5 Desplazamiento máximo y movimiento errático

Al saber que las larvas expuestas a mayores concentraciones de CBZ requieren un mayor número de estímulos, efecto que depende del tiempo de exposición. Se realizaron análisis enfocados a cuantificar la manera en que las larvas se desplazan y la distancia que recorren, para ello se hizo uso de la clasificación en los patrones de nado anteriormente descrita (Fig.13).

El primer análisis se enfocó en cuantificar el número de larvas que recorrió largas distancias para huir del estímulo táctil (desplazamiento máximo). En este análisis se consideraron todas las larvas que presentaron movimiento recto y errático como la parte de la población que logro salir del campo visión tras el estímulo táctil, esto se comparó con el total de larvas analizadas con la finalidad de obtener el porcentaje de desplazamiento máximo.

Se observó que el control de larvas durante las 72 hpf presentan un 90% de desplazamiento máximo, mientras que la mayoría de las larvas tratadas con CBZ a las distintas concentraciones tienen un desplazamiento similar al control exceptuando la de 10 ng/L, en las que se presenta solo un 68% de desplazamiento máximo (Fig.14). En larvas de 96 hpf, el control mantuvo un 90 % de desplazamiento máximo, durante este lapso de exposición las larvas

tratadas en un rango de 1 a 10 ng/L tuvieron un desplazamiento entre 88 y 85% respectivamente, mientras que las larvas expuestas en un rango de 100 a 100000 ng/L de CBZ se desplazaron 20% menos (Fig. 14). Los resultados preliminares durante las 120 hpf, reportaron un 70% de desplazamiento máximo en el control, mientras que en larvas tratadas se observa variabilidad en el efecto de la CBZ. A concentraciones bajas las larvas no se movieron (1 y 10 ng/L), sin embargo, a 1000 ng/L las larvas se desplazaron un 60% más, mientras que a las concentraciones más altas el desplazamiento disminuyó (Fig.19). Es necesario verificar que las concentraciones empleadas en este estudio sean las correctas y realizar más replicas para poder describir con mayor claridad este interesante hallazgo.

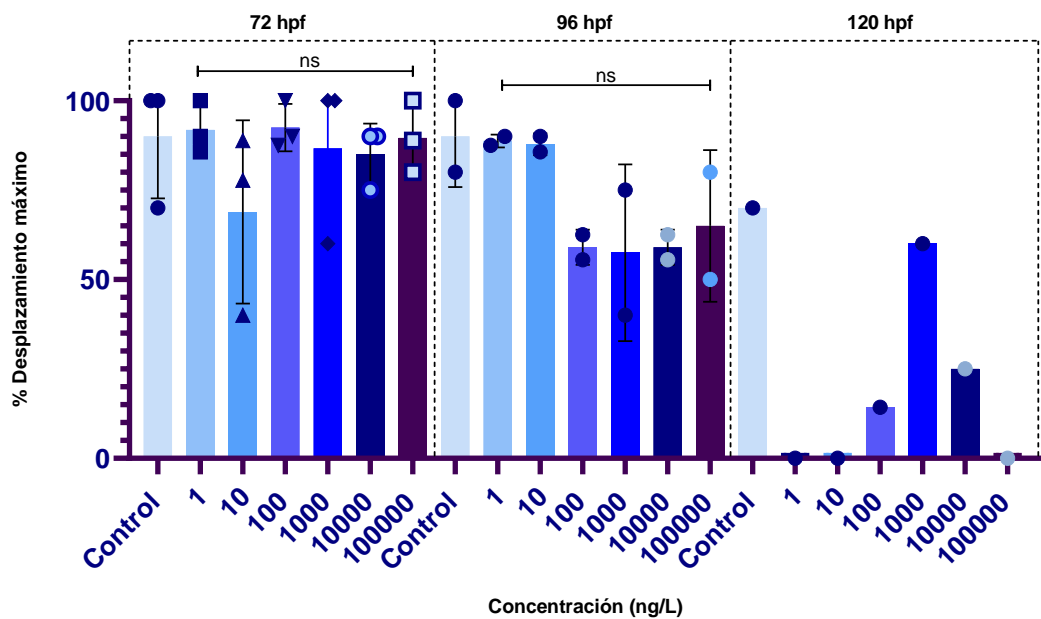


Figura 14: Cambios en el desplazamiento recorrido en larvas de pez cebra. 72 hpf: Control (n=22), 1 ng/L (n=22), 10 ng/L (n=23), 100 ng/L (n=23), 1000 ng/L (n=23), 10000 ng/L (n=24), 100000 ng/L (n=24), 96 hpf: Control (n=20), 1 ng/L (n=18), 10 ng/L (n=17), 100 ng/L (n=17), 1000 ng/L (n=18), 10000 ng/L (n=17), 100000 ng/L (n=18), 120 hpf: Control (n=10), 1 ng/L (n=7), 10 ng/L (n=8), 100 ng/L (n=7), 1000 ng/L (n=5), 10000 ng/L (n=8), 100000 ng/L (n=5) (* p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.001 y ns: no significativo).

El segundo análisis tuvo como objetivo cuantificar el número de larvas que se desplazaron de manera errática (Fig. 12). El número de larvas que presento un desplazamiento errático se comparó con el número de larvas que presentaron un desplazamiento máximo (larvas que al ser estimuladas nadaron fuera del campo de visión), de la comparación se obtuvo el %movimiento errático.

Los resultados señalan que durante las 72 hpf los controles nadan erráticamente un 15.87% (Fig.15). Sin embargo, el número de larvas expuestas que nadaron erráticamente incremento a 79 y 70% respectivamente entre las concentraciones 1 y 10 ng/L de CBZ, mientras que a partir de 100 ng/L el movimiento errático disminuyó (26.45%) y volvió a incrementar gradualmente a partir de 1000 ng/L.

Por otro lado, durante las 96 hpf el control presento un 21.25% de larvas que nadaron de manera errática. A diferencia de las 72 hpf, las concentraciones más

bajas mantuvieron un porcentaje de movimiento errático similar al control. Mientras que en un rango de 100 ng/l a 100000 ng/L de CBZ, la mayoría de larvas expuestas disminuyeron su distancia de desplazamiento máximo (Fig.16) por lo que la cuantificación del movimiento errático está limitada y no se consideró apto para evaluar bajo estas condiciones.

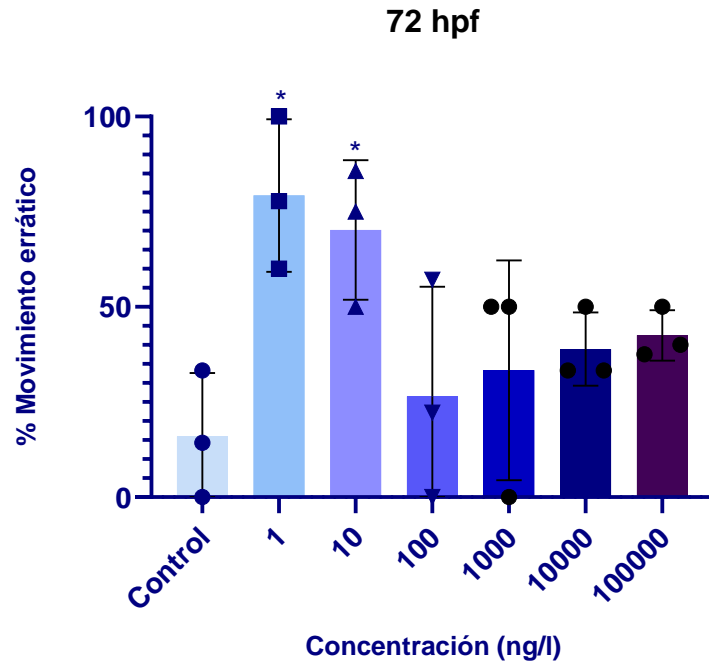


Figura 15: Cambios en el tipo de movimiento al efectuar el nado de larvas de 72 hpf. Control (n=19), 1 ng/L (n=20), 10 ng/L (n=17), 100 ng/L (n=20), 1000 ng/L (n=21), 10000 ng/L (n=22), 100000 ng/L (n=22) (* p<0.05, ** p<0.001 y *** p<0.001).

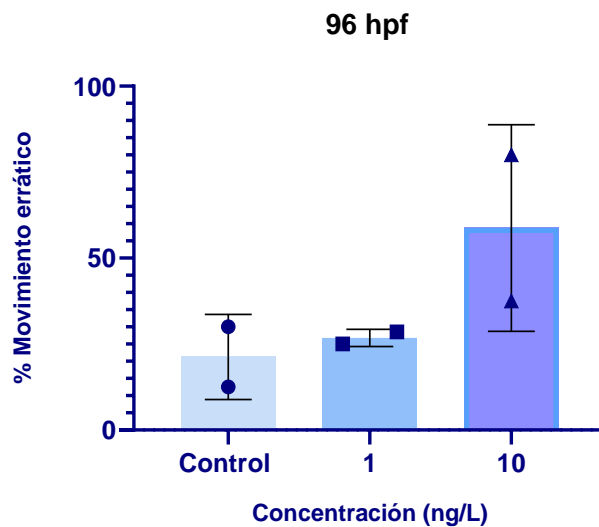


Figura 16: Cambios en el tipo de movimiento al efectuar el nado de larvas de 96 hpf. Control (n=18), 1 ng/L (n=15), 10 ng/L (n=13), 100 ng/L (n=7), 1000 ng/L (n=9), 10000 ng/L (n=10), 100000 ng/L (n=12) (* p<0.05, ** p<0.001 y *** p<0.001).

CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN

El presente estudio tenía como objetivo investigar los efectos de la CBZ sobre la viabilidad del desarrollo y el movimiento temprano en larvas de pez cebra tras 4 días de exposición. La discusión se encuentra dividida de la siguiente manera: **1)** El ensayo toxicológico donde se evaluó la supervivencia y viabilidad de los embriones expuestos a 96 hpf a diferentes concentraciones de CBZ, **2)** Los ensayos de motilidad donde se evaluó la respuesta al estímulo táctil a partir de las 72 hpf hasta las 120 hpf analizando el desplazamiento del nado y la manera en que lo hicieron.

5.1 Supervivencia

Durante el ensayo toxicológico nos hicimos la pregunta respecto a la alteración en la supervivencia y viabilidad de embriones y larvas expuestas a CBZ. Los resultados obtenidos mostraron que la exposición a CBZ no afecta significativamente ni la supervivencia ni la eclosión de los embriones de pez cebra en las concentraciones probadas. Estos resultados guardan relación con estudios realizados por Chen et al., 2020 y Fukushima et al., 2021, donde fueron usadas concentraciones similares. Sin embargo, la disminución en la sensibilidad de las larvas expuestas a 100,000 ng/L de CBZ podría afectar su supervivencia (Fig. 11). En un contexto natural, estas larvas serían menos perceptivas a los cambios en las corrientes de agua, lo que les dificultaría escapar de los depredadores.

5.2 Efectos en la motilidad de larvas de pez cebra

Los resultados señalan que la exposición de larvas de pez cebra a las concentraciones de CBZ halladas en la PTAR “Cerro de la Estrella” muestran una disminución en la sensibilidad para escapar de un estímulo mecánico a una concentración de 100,000 ng/L durante las 96 y 120 hpf (Fig.11). El efecto en la motilidad tendió a disminuir el desplazamiento dependiendo de la concentración y el tiempo. En las concentraciones más altas el desplazamiento tendió a disminuir conforme el tiempo de exposición sin una significancia estadística.

Durante las 72 hpf no se observó un efecto significativo en la motilidad, lo que se puede relacionar a que la mayoría de las larvas eclosionaron en este lapso, por tanto, el corión pudo actuar como una barrera en el que la difusión del fármaco fue mínima y el tiempo de exposición a la concentración administrada comenzó en ese momento.

Por otro lado, durante el estímulo táctil varias células del sistema nervioso son activadas a través de una serie de relevos de señalización hasta el cerebro. La

señal inicia a partir de las neuronas en la periferia que inervan células de la piel que permite percibir diferentes estímulos externos como los estímulos táctiles (Fig.22). Las principales neuronas encargadas de detectar este estímulo son las neuronas mecano-sensoriales Rohon Beard (RB), una población de neuronas tempranas que tienen una participación temporal durante el desarrollo a partir de las 17 hpf y desaparecen en su mayoría en el estadio de 120 hpf, sirven como mediadores iniciales de la sensación táctil, una función que es reemplazada posteriormente por las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) que coexisten hasta las 120 hpf (Fig.17). Bajo esta premisa, en el estadio de 72 hpf las neuronas RB y GRD están presentes, lo que sugiere que ambas poblaciones neuronales podrían tener un efecto sinérgico frente la constante exposición de CBZ, lo que ayudaría a tener otra del porque las larvas de 72 hpf no tienen un efecto. En este sentido, las larvas de las 96 hpf tienden a requerir un mayor número de estímulos para huir, lo que podría resaltar la importancia de la transición de las poblaciones neuronales en el efecto observado.

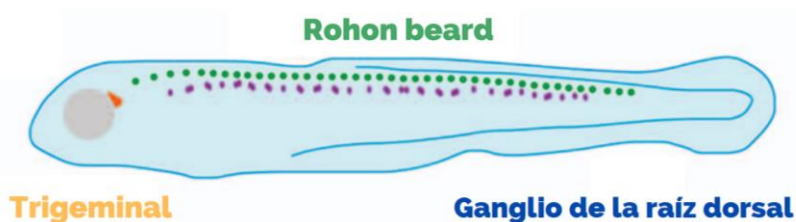


Figura 17: Diagrama de un pez cebra ~72 hpf que muestra la ubicación del ganglio trigémino (naranja), las neuronas Rohon Beard (verde) y Ganglio de la raíz dorsal (púrpura). En esta fase, las neuronas del trigémino inervan la piel de la cabeza y las neuronas de Rohon-Beard inervan el resto del cuerpo. Los DRG, que en esta fase constan de unas pocas células cada uno, se arborizan bajo los músculos en desarrollo; con el tiempo, las neuronas Rohon-Beard morirán y las neuronas DRG inervarán la piel (Wang et al., 2013)

Por otro lado, durante el ensayo toxicológico se observó una alta variabilidad en el desplazamiento y sensibilidad de larvas de pez cebra expuestas a CBZ. Esto podría explicarse debido a diferencias en el metabolismo de cada embrión y larva. En Ribbenstedt et al., 2022 se ha descrito que larvas de pez cebra pueden metabolizar CBZ, por otro lado, Valdés et al., 2016 han detectado CBZ acumulada en músculo y cerebro en ejemplares silvestres de *J. multidentata*, un pez de tamaño similar al pez cebra. Estas evidencias indican que la CBZ puede tener un potencial de bioacumulación, que podría ser metabolizada en un proceso variable. En otras palabras, las larvas podrían estar metabolizando más cantidad de CBZ que otras, lo que podría explicar la dispersión de los resultados para cada concentración. Por otro lado, un estudio realizado en larvas de 144 hpf expuestas a un rango 1000 a 100,000 ng/l (Chen et al., 2020), reportó que la CBZ tiene un efecto que no depende de la concentración, efecto que se sustenta con la variación en la expresión del neurotransmisor GABA ya que no tuvo un efecto lineal conforme las concentraciones de CBZ aumentaban. Efectos que

también se reportan en larvas juveniles de 21 días expuestas a benzodiazepina, un fármaco similar a la CBZ (Wu et al., 2020). Por tanto, en este estudio el tiempo de exposición a CBZ podría estar relacionado a un incremento constante en la expresión de neurotransmisores inhibitorios como GABA, lo que explicaría una menor sensibilidad a respuestas sensoriales y podría ser la causa de que las larvas tiendan a desplazarse menos.

En adición al incremento en el número de estímulos mecánicos, la mayoría de las larvas lograron desplazarse ciertas distancias con distintos patrones. En este estudio se observó que aproximadamente el 40% de larvas expuestas en las concentraciones más altas nadan distancias cortas a las 96 hpf, esto implica que aunado a la inhibición de las neuronas GRD, la CBZ también podría estar alterando la actividad neuronal de células implicadas en el movimiento, entre las que podrían estar involucradas las neuronas vGlut2⁺ y vGlut1⁺, estas neuronas glutamatérgicas codifican el inicio, la duración y los cambios de velocidad de locomoción. Se ha reportado que la ablación de las neuronas vGlut2⁺ compromete la natación de exploración lenta, mientras que la ablación de las neuronas vGlut1⁺ deteriora la natación rápida (Berg et al., 2023) Esta evidencia sugiere que el nado de corto alcance puede ser provocado por la inhibición del glutamato provocado por la CBZ y la falta de este neurotransmisor afecte la activación de las neuronas implicadas en el nado como vGlut2⁺ y vGlut1⁺. En ocasiones se observó que algunas larvas no respondían al límite de estímulos táctiles, pero si lograban nadar de una manera normal. Esto guarda relación con lo reportado por Honjo et al., 2011 en donde se describe que en mutantes sin GRD, las larvas mantienen un movimiento normal hasta la edad adulta.

Las células de Mauthner están involucradas en la activación neuronal ante un estímulo ya que participan en la sensibilidad para responder a las neuronas motoras y dan la direccionalidad en que se realizará el nado para escapar de la amenaza, estas neuronas son glutamatérgicas y hacen sinapsis con motoneuronas implicadas en la contracción muscular para comenzar el nado (Fig.18) (Christie, 2021). En este estudio, las larvas expuestas a concentraciones de 100,000 ng/L de CBZ a las 96 y 120 hpf necesitaron más estímulos para huir (y se desplazaron menos lo que podría sugerir indicar que la CBZ también podría afectar la señalización de las células de Mauthner a través del incremento en la expresión de GABA, potencializando células inhibitorias de tipo GABAérgicas que intervengan en la locomoción como las células CSF-cNs o también conocidas como células de Kolmer– Agdur que se encargan de regular el nado al inhibir motoneuronas específicas para dar paso a la contracción del músculo, por lo que las larvas podrían tener sensibilidad pero no poder huir con la misma eficiencia (Fidelin, 2015). Esto mismo podría estar implicado en el nado circular reportado en este estudio a las 72 hpf, debido al desbalance que hay entre neurotransmisores excitatorios e inhibitorios reportados por Chen et al., 2020. Aunque faltan estudios para entender cómo funciona la conducta locomotora en especial los procesos celulares que originan un movimiento errático, esta característica está relacionado a un comportamiento convulsivo, algo que no se esperaba de larvas expuestas a un anticonvulsivo. Sin embargo, se ha reportado

que un agonista del receptor GABA-B, potenció las descargas epileptiformes y que la CBZ no es efectiva para controlarlas (Gupta et al., 2001).

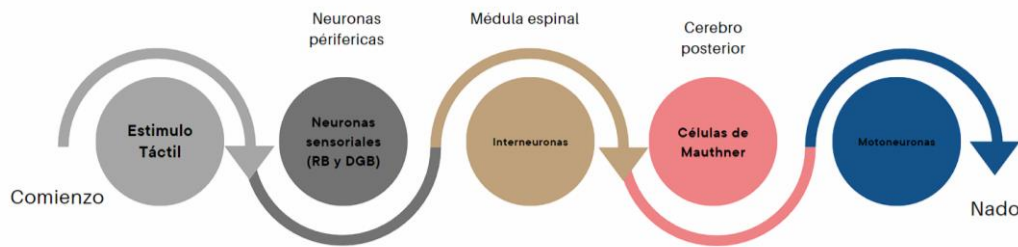


Figura 18: Vía de señalización neuronal provocado por un estímulo táctil. Las neuronas periféricas recolectan información constante de estímulos sensoriales externos (ej. Un estímulo mecánico) que se transmite a la médula espinal a través de interneuronas que dirigen la señal hacia el cerebro posterior donde se ubican las células de Mauthner que se encargan de activar a las motoneuronas del lado opuesto al que se percató el estímulo y llevar a cabo la respuesta de huida.

En resumen, este estudio tuvo como propósito conocer el impacto toxicológico de las concentraciones de CBZ presentes en la PTAR del Cerro de la Estrella tanto en la supervivencia como en la motilidad del pez cebra. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de estímulos necesarios para que las larvas tuvieran una respuesta de escape y una disminución en las distancias recorridas en el desplazamiento del nado conforme el tiempo de exposición avanzó, lo que sugiere que las células involucradas en el proceso de huida podrían estar afectadas por un desbalance en la actividad neuronal provocado por la CBZ.

CAPÍTULO 6 CONCLUSIÓN

- La investigación indica que la respuesta de las larvas de pez cebra a la carbamazepina puede variar según la duración de la exposición. Sin embargo, la elevada desviación estándar limita la solidez de esta afirmación. Son necesarios estudios adicionales con un mayor número de réplicas para confirmar estos hallazgos y esclarecer la relación dosis-respuesta.
- La exposición constante de 100,000 ng/l de carbamazepina tiene un impacto negativo en la sensibilidad de larvas de pez cebra para huir y desplazarse distancias largas durante el estadio de 96 hpf.
- En un rango de concentraciones de 100 a 100,000 ng/l de carbamazepina las larvas de pez cebra presentan una disminución en la respuesta a estímulos táctiles en el estadio de 120 hpf.
- La disminución en la respuesta a estímulos táctiles sugiere un efecto negativo en la activación de neuronas mecano-sensoriales y su señalización hacia las células de Mauthner que provocan la respuesta de escape. Sin embargo, la habilidad de nado en larvas de pez cebra es independiente del efecto del daño en neuronas RB y GRD lo que podría indicar que más poblaciones neuronales estén siendo afectadas y por ende las larvas nadan distancias cortas.

Perspectivas:

Este estudio es una base para experimentos posteriores, donde se evalúe la velocidad del nado, el tiempo de actividad y si el daño persiste después de las 120 hpf. También se podría explorar en ensayos conductuales como en la respuesta a estímulos vibracionales o visuales para consolidar las conexiones entre que células pueden estar involucradas en el mecanismo de acción de la carbamazepina. Finalmente, entender los cambios en los patrones moleculares y genéticos durante el desarrollo que disminuyen la motilidad en larvas de pez cebra.

Faltaría hacer repeticiones para poder realizar un análisis estadístico robusto y poder determinar aquellas diferencias con certidumbre. de manera adicional es necesario ahondar en ensayos conductuales en larvas, para seguir analizando el efecto de la CBZ encontrado a nivel celular. A su vez, se podrían decorionar a los embriones a partir de las 24 hpf para evaluar si el corion actúa como una barrera que impide un efecto perceptible a las 72 hpf. Por último, hacer un recambio del sobrenadante cada 24 horas para mantener la exposición a las mismas concentraciones de CBZ durante el desarrollo debido a que esta se metaboliza y las concentraciones en el medio pueden variar.

REFERENCIAS

- Alrashood, S. T. (2016). Carbamazepine. En Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology (Vol. 41, pp. 133-321). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.11.001>
- Bambino, K., & Chu, J. (2017). Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. En Current Topics in Developmental Biology (Vol. 124, pp. 331-367). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.007>
- Berg, E. M., Mrowka, L., Bertuzzi, M., Madrid, D., Picton, L. D., & El Manira, A. (2023). Brainstem circuits encoding start, speed, and duration of swimming in adult zebrafish. *Neuron*, 111(3), 372-386.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.034>
- Bertram, M. G., Martin, J. M., McCallum, E. S., Alton, L. A., Brand, J. A., Brooks, B. W., Cervený, D., Fick, J., Ford, A. T., Hellström, G., Michelangeli, M., Nakagawa, S., Polverino, G., Saaristo, M., Sih, A., Tan, H., Tyler, C. R., Wong, B. B. M., & Brodin, T. (2022). Frontiers in quantifying wildlife behavioural responses to chemical pollution. *Biological Reviews*, 97(4), 1346-1364. <https://doi.org/10.1111/brv.12844>
- Braunbeck, T., & Lammer, E. (s. f.). GERMAN FEDERAL ENVIRONMENT AGENCY PO Box 1406 · D-06813 Dessau. 203.
- Chávez, A., Maya, C., Gibson, R., & Jiménez, B. (2011). The removal of microorganisms and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico. *Environmental Pollution*, 159(5), 1354-1362. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.008>
- Chen, H., Yang, H., Zhao, Y., Gu, X., & Martyniuk, C. J. (2020). Development and Molecular Investigation into the Effects of Carbamazepine Exposure in the Zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(23), 8882. <https://doi.org/10.3390/ijerph17238882>
- CONAGUA. (2021). Situación del Subsector: Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Edición 2021. (CONAGUA). <https://agua.org.mx/biblioteca/situacion-del-subsector-agua-potable-alcantarillado-y-saneamiento-edicion-2021-conagua/>
- da Silva Santos, N., Oliveira, R., Lisboa, C. A., Mon e Pinto, J., Sousa-Moura, D., Camargo, N. S., Perillo, V., Oliveira, M., Grisolia, C. K., & Domingues, I. (2018). Chronic effects of carbamazepine on zebrafish: Behavioral, reproductive and biochemical endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.0>
- Décima, M. A., Marzeddu, S., Barchiesi, M., Di Marcantonio, C., Chiavola, A., & Boni, M. R. (2021). A Review on the Removal of Carbamazepine from Aqueous Solution by Using Activated Carbon and Biochar. *Sustainability*, 13(21), 11760. <https://doi.org/10.3390/su132111760>

- Di Marcantonio, C., Chiavola, A., Dossi, S., Cecchini, G., Leoni, S., Frugis, A., Spizzirri, M., & Boni, M. R. (2020). Occurrence, seasonal variations and removal of Organic Micropollutants in 76 Wastewater Treatment Plants. *Process Safety and Environmental Protection*, 141, 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.05.032>
- Di Marcantonio, C., Chiavola, A., Gioia, V., Frugis, A., Cecchini, G., Ceci, C., Spizzirri, M., & Boni, M. R. (2022). Impact of COVID19 restrictions on organic micropollutants in wastewater treatment plants and human consumption rates. *Science of The Total Environment*, 811, 152327. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152327>
- Durán-Álvarez, J. C., Prado, B., González, D., Sánchez, Y., & Jiménez-Cisneros, B. (2015). Environmental fate of naproxen, carbamazepine and triclosan in wastewater, surface water and wastewater irrigated soil—Results of laboratory scale experiments. *Science of The Total Environment*, 538, 350-362. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.028>
- Fidelin, K., Djenoune, L., Stokes, C., Prendergast, A., Gomez, J., Baradel, A., Del Bene, F., & Wyart, C. (2015). State-Dependent Modulation of Locomotion by GABAergic Spinal Sensory Neurons. *Current Biology*, 25(23), 3035-3047. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.070>
- Fukushima, H. C. S., Bailone, R. L., Corrêa, T., Janke, H., De Aguiar, L. K., Setti, P. G., & Borra, R. C. (2021). Zebrafish toxicological screening could aid Leishmaniosis drug discovery. *Laboratory Animal Research*, 37(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s42826-021-00104-1>
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., van de Zee, S. E. A. T. M., & Ritsema, C. J. (2015). Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(1), 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>
- Gibson, R., Durán-Álvarez, J. C., Estrada, K. L., Chávez, A., & Jiménez Cisneros, B. (2010). Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*, 81(11), 1437-1445. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.006>
- Goody, M., & Henry, C. (2013). Motility Assay for Zebrafish Embryos. *BIO-PROTOCOL*, 3(11). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.787>
- Hagen, P. E., & Walls, M. P. (2005). The Stockholm Convention On Persistent Organic Pollutants. *Natural Resources & Environment*, 19(4), 49-52.
- Hai, F., Yang, S., Asif, M., Sencadas, V., Shawkat, S., Sanderson-Smith, M., Gorman, J., Xu, Z.-Q., & Yamamoto, K. (2018). Carbamazepine as a Possible Anthropogenic Marker in Water: Occurrences, Toxicological Effects, Regulations and Removal by Wastewater Treatment Technologies. *Water*, 10(2), 107. <https://doi.org/10.3390/w10020107>

Honjo, Y., Payne, L., & Eisen, J. S. (2011). Somatosensory mechanisms in zebrafish lacking dorsal root ganglia: Somatosensory mechanisms in juvenile zebrafish. *Journal of Anatomy*, 218(3), 271-276. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01337.x>

Jacquín, L., Petitjean, Q., Côte, J., Laffaille, P., & Jean, S. (2020). Effects of Pollution on Fish Behavior, Personality, and Cognition: Some Research Perspectives. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 86. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00086>

Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Craddock, C., Kyzar, E. J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., ... Schneider, and the Zebrafish Neuros, H. (2013). Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70-86. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253-310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J. R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N. (Nil), Baldé, A. B., Bertollini, R., Bose-O'Reilly, S., Boufford, J. I., Breyse, P. N., Chiles, T., Mahidol, C., Coll-Seck, A. M., Cropper, M. L., Fobil, J., Fuster, V., Greenstone, M., Haines, A., ... Zhong, M. (2018). The Lancet Commission on pollution and health. *The Lancet*, 391(10119), 462-512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)

Lesser, L. E., Mora, A., Moreau, C., Mahlknecht, J., Hernández-Antonio, A., Ramírez, A. I., & Barrios-Piña, H. (2018). Survey of 218 organic contaminants in groundwater derived from the world's largest untreated wastewater irrigation system: Mezquital Valley, Mexico. *Chemosphere*, 198, 510-521. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.154>

Loos, R., Gawlik, B. M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., & Bidoglio, G. (2009). EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*, 157(2), 561-568. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.020>

Martínez Garay, A. Y., & Ramírez García, J. J. (2013). Cuantificación de Carbamazepina en efluentes hospitalarios por cromatografía de líquidos de alta resolución y de la determinación de la Cinética de Degradación. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/13916>

Matalon, S., Schechtman, S., Goldzweig, G., & Ornoy, A. (2002). The teratogenic effect of carbamazepine: A meta-analysis of 1255 exposures. *Reproductive Toxicology*, 16(1), 9-17. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(01\)00199-X](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(01)00199-X)

McGrath, P., & Li, C.-Q. (2008). Zebrafish: A predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today*, 13(9-10), 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.03.002>

Miller, J. R., & Orbock Miller, S. M. (2007). Contaminated rivers: A geomorphological-geochemical approach to site assessment and remediation. Springer.

Valeria Joffre Macedo Negrete. (2019). Uso del pez cebra como biomarcador para evaluar la calidad y seguridad del agua renovada de la Planta de Tratamiento de aguas Residuales del Cerro de la Estrella. Universidad Autónoma Metropolitana.

O'Flynn, D., Lawler, J., Yusuf, A., Parle-McDermott, A., Harold, D., Mc Cloughlin, T., Holland, L., Regan, F., & White, B. (2021). A review of pharmaceutical occurrence and pathways in the aquatic environment in the context of a changing climate and the COVID-19 pandemic. *Analytical Methods*, 13(5), 575-594. <https://doi.org/10.1039/D0AY02098B>

Petersen, B. D., Bertocello, K. T., & Bonan, C. D. (2022). Standardizing Zebrafish Behavioral Paradigms Across Life Stages: An Effort Towards Translational Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 833227. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.833227>

Qiang, L., Cheng, J., Yi, J., Rotchell, J. M., Zhu, X., & Zhou, J. (2016). Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior. *Ecotoxicology*, 25(7), 1426-1437. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1694-y>

Quadra, G. R., Oliveira de Souza, H., Costa, R. dos S., & Fernandez, M. A. dos S. (2017). Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1200-1218. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7789-4>

Ramos Ramírez, I. A., Chávez Mejía, A., Universidad, N. A. de M., Universidad, N. A. de M., & Universidad, N. A. de M. (2021). Uso de indicadores biológicos para garantizar la calidad y seguridad del agua renovada para uso directo, viabilidad económica, social, medioambiental del reúso de agua en Iztapalapa, CDMX.

Ribbenstedt, A., Posselt, M., & Benskin, J. P. (2022). Toxicometabolomics and Biotransformation Product Elucidation in Single Zebrafish Embryos Exposed to Carbamazepine from Environmentally-Relevant to Morphologically Altering Doses. *Chemical Research in Toxicology*, 35(3), 431-439. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00335>

Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin, F. S., Lambin, E. F., Lenton, T. M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H. J., Nykvist, B., de Wit, C. A., Hughes, T., van der Leeuw, S., Rodhe, H., Sörlin, S., Snyder, P. K., Costanza, R., Svedin, U., ... Foley, J. A. (2009). A safe operating space for humanity. *Nature*, 461(7263), 472-475. <https://doi.org/10.1038/461472a>

Rout, P. R., Zhang, T. C., Bhunia, P., & Surampalli, R. Y. (2021). Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A

review. *Science of The Total Environment*, 753, 141990. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141990>

Salahinejad, A., Meuthen, D., Attaran, A., Chivers, D. P., & Ferrari, M. C. O. (2023). Effects of common antiepileptic drugs on teleost fishes. *Science of The Total Environment*, 866, 161324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161324>

Singh, J., Yadav, P., Pal, A. K., & Mishra, V. (2020). Water Pollutants: Origin and Status. En D. Pooja, P. Kumar, P. Singh, & S. Patil (Eds.), *Sensors in Water Pollutants Monitoring: Role of Material* (pp. 5-20). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0671-0_2

Tiwari, B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R. D., & Buelna, G. (2017). Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. *Bioresource Technology*, 224, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.042>

Valdés, M. E., Huerta, B., Wunderlin, D. A., Bistoni, M. A., Barceló, D., & Rodríguez-Mozaz, S. (2016). Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolization by fish. *Science of The Total Environment*, 557-558, 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.045>

van den Brandhof, E.-J., & Montforts, M. (2010). Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(8), 1862-1866. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.031>

Wang, F., Julien, D. P., & Sagasti, A. (2013). Journey to the skin: Somatosensory peripheral axon guidance and morphogenesis. *Cell Adhesion & Migration*, 7(4), 388-394. <https://doi.org/10.4161/cam.25000>

Westerfield, Monte. (s. f.). ZFIN: Zebrafish Book: Contents. Recuperado 7 de febrero de 2023, de https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html

Wilkinson, J. L., Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Leung, K. M. Y., Lai, R. W. S., Galbán-Malagón, C., Adell, A. D., Mondon, J., Metian, M., Marchant, R. A., Bouzas-Monroy, A., Cuni-Sanchez, A., Coors, A., Carriquiriborde, P., Rojo, M., Gordon, C., Cara, M., Moermond, M., Luarte, T., ... Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(8), e2113947119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>

Wu, M., Qiu, X., Chen, C., Chen, K., Li, M., Xu, H., Wu, X., Shimasaki, Y., & Oshima, Y. (2020). Short-term and persistent impacts of sublethal exposure to diazepam on behavioral traits and brain GABA levels in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Science of The Total Environment*, 740, 140392. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140392>

Zhang, Y., Geißen, S.-U., & Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies.

Chemosphere, 73(8),
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>

1151-1161.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CONTROL ESCOLAR DE LICENCIATURA



VOTOS DE APROBATORIOS



**SECRETARIA EJECUTIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el **C. CARRASCO TORRES JOSEPH LENIN** con número de matrícula **10018620** cuyo título es:

Impacto de la carbamazepina en el desarrollo embrionario del pez cebra

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 18 de junio de 2024

Atentamente
Por una humanidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVÁEZ PADILLA	(PRESIDENTE)
DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA	(SECRETARIO)
DRA. DENHI SCHNABEL PERAZA	(VOCAL)
DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE	(SUPLENTE)
DRA. LILIANA PARDO LÓPEZ	(SUPLENTE)

MIE/VRRC/eae



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo certificados.titulacionesiicba@uaem.edu.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2024-06-18 09:04:39 | FIRMANTE

BRZ1radQwIKo0upbVDFvjsfy6lfdJ1w/yYsMAG58RNfn/pAqEmMx8rAev0zxcGCMXk9EgUrrn6gATA1+EZjz0NCKjnlquLBNodclm9z95g69Y721sdzscUNvng4QTP7y56xLSTio111700g08clsrZTROCBq1OoKKhD1Flo1W+Z+uUEbCmsTVIAu777YcMEKT175Qt8LukFpSTcg7tBea+Lbpj3kvWxckt2mxKMUIJq2a2kXs0w63hrJ23oU0c8tJGlyTv/XQZz400AaVcylV+1sfAqnb0wC7Z/B6F4Ld6M1zVRq90tKy0yM9dkhQXuPcHh9p5oGCEKdiOYkmQ==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2024-06-18 10:27:06 | FIRMANTE

WQPbyn3l5xcN35SuguLgKoonJmbD6no9RgHBvi31JVJXGZ9p2LWgBPVL+NsfmbnngNUD/4M+mmzm5OjU6vYjUARlqVmEayUHHtGmDqBZ45XECTmxtNfeZ40xwBRkSD3nxJ66yGMRExkXjz+h7njiOpmTOTNIDWBNjgiqj8efllW2eqh+z5WWzdYrV8/X5gsQ3lxQsq/F9fJoac6B/PF7Sjgl3V46lINBQMCrk+eZe7egC5gU3S55bcKAaHTaHDJKlATfWlquPWkUB5fmRiWe7gls19zSBtQvRD+5Jd1ybwhaq16BtxtZVA7qUd/Lzgnmh5AHTpjiy2kq85bikmKg==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2024-06-18 13:10:30 | FIRMANTE

tFUYZNhIw046P7MMYkh6pHM6sD6z7J4V58chwQn9e/eymRuXNTuzaSei0At9yDJl0iqaEwvpaSwJ4JfeO+ZEgTtHQ0VHqX+zITyZoyj8aPltcUb/+b9W6nlv2PwmnGS3mmyjpEB73EmoFQzIqftfEMe0U23Fa3kjGq00/30Vtkcxyz57kOjr0teQLhE5UMM/PAsrVuEDojCm6QrxbMzqAkNXyAeaKGL7jz2hqvLWKlHkS8AKpTIGsw+H3bEPa2J1PVq09VPM5Ek8wjwN33DNBZk6jvCmH3ibEoe77KYU/86j/MVT0qbis1PONfPwihFU+p1rOcyizTS3t2wyJvPA==

DENHÍ SCHNABEL PERAZA | Fecha:2024-06-19 18:15:45 | FIRMANTE

fayik1hl6TcUno2odLPPsCq9VZ+Lnr5Mk+bDj1sD5DSldy+JbnC/suqj9peLiqP8y9hssauS77KsfM6lNPdMlrl8PSEy1IPjBPsMMBnHHRixVehaZVbYmKaW5bz2Px8mPZfV5VRdu/jgXb4UpsHADWkBkH+GdJGAbmT71kge8m4EKnJOhrXeDmsabFS6V2fdSwzKtzLROAV0cDY5OVh6YHcGcgdis1Z8bKkFNxUQGbxCHeQeFuTThHvOr+DO1octpYQpLQV0cSvJTpuFt4wGssFmuEqPbYEr4Htk440BCVW2ipiLM5vSPCQjLNHCbV3R3yie7ylaWn9hiL+EgA==

LILIANA PARDO LÓPEZ | Fecha:2024-06-20 09:06:13 | FIRMANTE

m4QDa7+B/MLmiOgRixHNTC9GMNOAmPGAyRMkj5DXCPGX0/uc5q6hk5kPe2XkK26gUuEcm9Vfvf7739dWoc4EbbeG3ADg6aldnatNt/z4rbFxBcZgcpCDA2Wfiddan6Y3/uDS C0QFUp3RZ0GloUhtDwRxcXTOGxbAcVxcAYmydCpOiQsedfFgENPPPBKsAYVtxtMOiGOR5fhUXXaTkC5PaOfwlk1pJwKf/Szpw+rX5mGno/Ovwe/wPr2Sm4R2hVG455otiKsoZCcm5ulX6PsRx/M8Jc3t9GPF4f3vFzqU3UqVnWijp02QrQJOpkl/6Aim8Uxtes3FmfAjhwhe3sg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



HKTONRZV1

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JCKug9oPuQkeYc5a9Q5Pr8JluGTV870n>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029