



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD INDUCIDA
POR EFLUENTES HOSPITALARIOS SOBRE *Cyprinus carpio***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:
Q.F.B. CORINA GABRIELA OLVERA NESTOR

DIRIGIDO POR:
DR. en C.Q.B. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN
DR. en C.Q. ENRIQUE MORALES ÁVILA
DRA. en C.Q.B. MARCELA GALAR MARTÍNEZ



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO. DICIEMBRE 2013

INDICE GENERAL

CAPÍTULO I." ANTECEDENTES"

1. RESUMEN	5
2. SUMMARY	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVOS.....	15
5.1. GENERAL.....	15
5.2. ESPECÍFICOS	15
6. METODOLOGÍA.....	16
6.1. MUESTREO.....	16
6.2. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO	16
6.3. ORGANISMOS DE PRUEBA (<i>CYPRINUS CARPIO</i>)	17
6.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL MEDIO SINTÉTICO.....	17
6.6. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA	17
6.7. ENSAYO DE TOXICIDAD SUBLETAL	18
6.8. DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD.....	18
6.9. EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD	18
6.9.1. MICRONÚCLEOS (MN).....	18
6.9.2. TUNEL.....	19
6.10. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD.....	20
6.10.1. CASPASAS	20
6.10.2. LACTATO DESHIDROGENASA (LDH).....	20
6.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20

CAPÍTULO II."DISCUSIÓN DE RESULTADOS"

CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

INDICE DE FIGURAS

1. **Figura 1.** Actividad de Lactato Deshidrogenasa (LDH)
2. **Figura 2.** Actividad de la Caspasa 3 en sangre
3. **Figura 3.** Porcentaje de Apoptosis relacionado con el Grupo Control
4. **Figura 4.** Relación entre la Actividad de Caspasa 3 y la Apoptosis
5. **Figura 5.** Generación de Micronúcleos

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1. RESUMEN

Los hospitales consumen importantes volúmenes de agua por día, generando cantidades similares de agua residual con microorganismos patógenos, fármacos o sustancias químicas que pueden o no ser metabolizados, etc. Estos efluentes pueden o no ser tratados, afectando la calidad del agua y poniendo en riesgo al medio ambiente y a la salud pública, ya que son capaces de ocasionar efectos tóxicos entre los que resaltan los genotóxicos, mutagénicos y citotóxicos; ya que son una mezcla compleja, cuya actividad dependerá de interacciones sinérgicas y antagónicas entre sus componentes. La composición de estos efluentes varía continuamente debido a la gran diversidad de medicamentos, desinfectantes, solventes, reactivos de laboratorio, detergentes y otros compuestos vertidos a los mismos. En el presente trabajo se determinó el daño genotóxico y citotóxico producido por efluentes hospitalarios sobre *Cyprinus carpio*. En este trabajo pretendía evaluar el efecto tóxico de los efluentes hospitalarios y el estatus de salud de diversos bioindicadores. Los sistemas de prueba consistieron en 3 peceras de 6 organismos de prueba y 1 pecera de 6 organismos como lote testigo. Se sometió a *Cyprinus carpio* a la exposición de efluentes de la unidad de medicina familiar del IMSS No. 222, durante 96 horas (considerando el LOAEL – Nivel mínimo de Efecto Adverso Observado -) El daño citotóxico se evaluó por medio de la actividad de la caspasa 3 y mediante la actividad de Lactato Deshidrogenasa (LDH) y la genotoxicidad por medio de micronúcleos y la prueba de TUNEL. Las pruebas se realizaron por triplicado. Las diferencias se consideraron significativas con una $P < 0.05$. Estos conocimientos permitieron caracterizar daños a nivel genético y celular de los contaminantes presentes en efluentes hospitalarios.

2. SUMMARY

Hospitals consume large amounts of water per day , generating similar quantities of residual water with pathogenic microorganisms , drugs or chemicals that may or may not be metabolized , etc. These effluents can be treated or not , affecting water quality and threatening the environment and public health, as they are a complex mixture whose activity depends on synergistic and antagonistic interactions between its components, they can cause toxic effects such as genotoxic , mutagenic and cytotoxic ones. The composition of these effluents varies continuously due to the large variety of medicines , disinfectants , solvents , laboratory reagents , detergents and other compounds discharged into them. In this study it was determined the genotoxic and cytotoxic damage caused by hospital effluents on *Cyprinus carpio* . This research aims to evaluate the toxic effect of hospital effluents and the health status of several biomarkers . Test systems consisted of 3 tanks with 6 test organisms and 1 tank with 6 organisms as control group . *Cyprinus carpio* was exposed to effluent from the clinic IMSS No. 222, for 96 hours (considering the LOAEL - Lowest Observed Adverse Effect Level -). The cytotoxic damage was assessed by the activity of the caspase 3 and by lactate dehydrogenase activity (LDH) and genotoxicity by micronucleus and TUNEL test.

The tests were performed in triplicate . Differences were considered significant at $P < 0.05$. This knowledge allowed characterizing genetic and cellular damage caused by contaminants in hospital effluents.

3. INTRODUCCIÓN

En 2008, en el Estado de México la disponibilidad promedio diaria de agua por cada uno de los más de 14 millones de habitantes del Estado fue menor a 270 litros / persona. (Comisión Nacional del Agua). Las actividades antropogénicas han propiciado el incremento en su consumo y como consecuencia serios problemas de contaminación en los ecosistemas (Duffus, 2003) Además, se han identificado contaminantes más peligrosos en los ecosistemas acuáticos debido a su persistencia, ya que a diferencia de otros xenobióticos no se pueden biotransformar, pero si se pueden acumular en los diferentes compartimentos de la columna de agua, favoreciendo en algunos casos su disponibilidad y su ingreso a los diferentes hidrobiontes (Martínez Tabche *et al.* 2000).

Parte de la demanda diaria se concentra en lugares públicos. En este sentido se ha observado que los hospitales consumen un volumen diario de agua significativo, el cual oscila en el rango de 400 a 1,200 litros / cama (Ramos, 2008).

El consumo de agua en los hospitales genera a su vez significantes volúmenes de aguas residuales cargadas de compuestos químicos tóxicos, materia orgánica, residuos de fármacos, metales pesados, compuestos órgano-halogenados, antisépticos, detergentes, solventes, medicamentos, excretas, secreciones humanas, además de microorganismos patógenos (enterobacterias, coliformes fecales, entre otros) (Kümmerer 2001; Emmanuel *et al.* 2005).

Dichos efluentes hospitalarios son descargados, sin tratamiento previo a la red municipal, junto con las aguas residuales domésticas (Gupta *et al.* 2009).

Estos efluentes hospitalarios son una mezcla compleja, cuya actividad tóxica, mutagénica y genotóxica dependerá de interacciones sinérgicas y antagónicas entre sus componentes, por lo cual, son capaces de generar serios problemas ambientales, pudiendo llegar a ser de 5 a 15 veces más tóxicos que los efluentes domésticos, constituyendo un riesgo potencial para el ser humano y el ambiente, lo que se traduce en un impacto para la salud pública (Ortolan 1999, Ramos, 2008). La magnitud de dicho impacto ha comenzado a evaluarse en los últimos años en ámbitos

científicos y gubernamentales (Dremont y Hadjali 1997, Pruess *et al.* 1999, Bassi y Moretton 2003, Paz *et al.* 2004, Nuñez y Moretton 2006).

Actualmente se conocen los efectos tóxicos de diversas sustancias químicas como fármacos, desinfectantes, colorantes y solventes, sobre los organismos acuáticos, de las cuales varias podrían estar presentes en los efluentes residuales hospitalarios, constituyendo un riesgo potencial para el balance biológico natural de los ecosistemas acuáticos ((Pro *et al.* 2003; Ferrari *et al.* 2004; Sano *et al.* 2005; Liu *et al.* 2011, Santos *et al.* 2010). Se ha evaluado toxicidad en algas fotosintéticas como el zooplancton herbívoro, el cual es de importancia en estos ecosistemas, ya que representa la base de la cadena trófica y cualquier alteración en la abundancia y composición de esta comunidad puede ocasionar efectos severos en organismos de niveles superiores; las algas fitoplanctónicas son de importancia en la detección de los efectos ecotoxicológicos de bajas concentraciones de algunos fármacos encontrados en muestras ambientales (Blaise *et al.* 2006)

La genotoxicidad producida por los efluentes hospitalarios ha sido documentada, generalmente mediante el ensayo de Ames que utiliza cepas mutadas de *Salmonella typhimurium* (Maron y Ames 1983 Ohe *et al.* 2004; Jolibois y Guerbet 2005; Ferk *et al.* 2009; Gupta *et al.* 2009). Por ejemplo, los fármacos antineoplásicos (citostáticos), tienen una baja biodegradabilidad en el ambiente, capaces de producir efectos citotóxicos e interferir en la estructura y función del ADN produciendo efectos genotóxicos, mutagénicos, carcinogénicos o teratogénicos en los organismos (Kümmerer *et al.* 2000; Jolibois *et al.* 2003; Zoumkova *et al.* 2010). Los antibióticos tienen una amplia actividad biológica y potencial ecotoxicológica sobre varios organismos incluyendo algas y microcrustáceos, afectando su crecimiento y los procesos fisiológicos (Berto *et al.* 2009; Turkdogan y Yetilmezsoy 2009; Liu *et al.* 2011). En los peces se ha observado que los antiinflamatorios no esteroideos provocan cambios en el metabolismo respiratorio, disminución en el ritmo cardíaco, irregularidades en el desarrollo, oclusión de branquias y cambios en la conducta natatoria estando además, estas afecciones relacionadas con daño a macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN (Páez, 1996).

Las aguas residuales de los hospitales pueden contener diferentes compuestos químicos que afectan de manera indirecta a los ecosistemas acuáticos, tal como lo describen diferentes autores

por lo cual, la mezcla compleja de compuestos pueda presentar efectos tóxicos y/o genotóxicos sobre el ambiente, aunque dichos compuestos se encuentren en pequeñas cantidades (Jolibois y Guerbet 2005; Gupta *et al.* 2009; Santos *et al.* 2009).

Para el estudio de los efectos de agentes contaminantes en los cuerpos de agua es necesario el uso de bioindicadores, los cuales son atributos de los sistemas biológicos que se emplean para descifrar factores de su ambiente. Inicialmente, se usaban especies o asociaciones de éstas como indicadores y, posteriormente comenzaron a utilizarse también atributos correspondientes a otro nivel de organización del ecosistema, como poblaciones y comunidades, lo que resultó particularmente útil en estudios de contaminación (Chihuailaf 2002).

En la caracterización de la respuesta tóxica es también importante hacer la correcta selección de los bioindicadores que serán empleados en los estudios; de acuerdo al *Committee on Biomarkers*, un bioindicador se define como un sistema que generalmente incluye un subsistema de un organismo completo para identificar un punto final específico. Para la U.S. *Environmental Protection Agency* (USEPA) se define como un evaluador de contaminantes o de su efecto biológico, el cual considera órganos o tejidos de organismos (Butterworth *et al.* 1995). Ron Van Der Oost *et al.* (2003) los define como un cambio en la respuesta biológica, física o química, la cual puede estar relacionada con los efectos tóxicos o de exposición a químicos ambientales.

La genética toxicológica o genotoxicidad puede definirse como el estudio de los xenobióticos que inducen cambios en el material genético y contempla dos aspectos:

1. Identificar los contaminantes que puedan alterar al ADN.
2. La consecuencia de la progresión y expresión del daño al ADN en genes mutados, que pueden ser hereditarios.

La detección y cuantificación de dichos eventos puede emplearse como biomarcadores en organismos expuestos.

Esta disciplina debe de enfocarse en tres niveles:

1. Identificar el grado y frecuencia de las enfermedades genéticas.
2. Evaluar los posibles agentes que puedan generar un daño genético }
3. Estudiar los mecanismos de acción de los tóxicos que causan desórdenes genéticos (Van Der Oost et al., 2003)

Características del Bioindicador: *Cyprinus carpio*

La carpa común *Cyprinus carpio*, es un organismo natural de Asia, pero su extensa introducción a diversos cuerpos de agua lo hace actualmente uno de los más distribuidos a nivel mundial. Son organismos omnívoros con predominancia bentófila, aspiran y filtran fango del fondo, así como insectos y plantas de la superficie. En su etapa juvenil se alimenta principalmente de algas, rotíferos y crustáceos microscópicos (Koehn, 2004). Las primeras etapas de su ciclo de vida (embriones, larvas y juveniles) son los más vulnerables a la contaminación, a las fluctuaciones de la temperatura, a la concentración de oxígeno, a la salinidad y a la depredación.

Estrés oxidativo

El potencial de los radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno (RO'S) para dañar los tejidos y los componentes celulares es llamado estrés oxidativo, en los sistemas biológicos su determinación puede ser usada para medir los efectos tóxicos producidos por las condiciones ambientales, incluyendo la exposición a contaminantes, los cuales inducen especialmente una variedad de mecanismos tóxicos como puede ser el daño oxidativo a lípidos de membrana, cambios en la proteínas antioxidantes y especialmente en al ADN (Valavanidis *et al* 2006).

Evaluación de Daño Genotóxico

Las lesiones más predominantes observadas debido a los daños en el ADN en organismos acuáticos, incluyen rompimientos de las cadenas (rompimientos de cadena sencilla o doble), modificaciones en las bases y entrecruzamientos, causando efectos adversos en la estabilidad del ecosistema, por lo que en los últimos años, técnicas como el ensayo cometa y laa

determinación del contenido del ADN, así como la identificación de aneuploidias por citometría de flujo, han resultado excelentes herramientas para detectar daños al ADN en especies acuáticas (Kim y Hyun, 2006).

En el caso del ensayo cometa se puede evaluar el daño al ADN en células individuales, incluyendo rompimientos simples o dobles, sitios álcali lábiles y la escisión incompleta de los eventos de reparación. Esta técnica posee una alta sensibilidad, por lo que es ampliamente usada en el área de genética toxicológica y como biomarcador ambiental (Guecheva *et al.* 2001). También se han incorporado al ensayo endonucleasas para detectar bases oxidadas, como la FPG y la ENDO III, dichas enzimas reconocen a las bases nitrogenadas púricas y pirimídicas oxidadas respectivamente (Migliore *et al.* 2002).

La citotoxicidad es una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. Diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. (Arencibia *et al.* 2003).

El ciclo celular es el proceso por el cual la célula crece y duplica todas sus estructuras, incluyendo la información genética, para finalmente dividirse y dar origen a dos células hijas idénticas que repiten el proceso. Este empieza a partir de una célula que posee una cantidad muy baja de ATP, por lo que, la célula inicia una acumulación de ATP e incrementa su tamaño, eventos que ocurren durante la fase G1 que es la parte más larga del ciclo. Una vez que la célula tiene suficiente ATP y un tamaño adecuado se comienza la síntesis de ADN (replicación). En esta etapa denominada S, se obtiene una copia del ADN original. El proceso de síntesis consume una gran cantidad de ATP, por lo que es necesario un segundo periodo de acumulación de energía, denominada fase G2. La energía adquirida de la fase G2 es empleada para el proceso de mitosis. La progresión ordenada de las células a través de las diversas fases depende de las ciclinas, las CDK e inhibidores de las CDK. Las CDK se encuentran presentes en el ciclo celular, sin embargo, solo se activan al ser fosforiladas tras la unión de las ciclinas. En contraste, las ciclinas se sintetizan durante fases específicas del ciclo. La actividad

de los complejos ciclina-CDK está regulada por los inhibidores de CDK. Existen dos clases principales, las familias Cip/Kip (p21, p27 y p57) y las INK4/ARF, su función es la de inactivar los complejos ciclina-CDK (Kumar *et al.* 2005).

El ciclo celular depende de la eficiencia en la transición de sus fases, durante procesos de estrés, es común que las células entren en pausa (puntos de control) hasta que se repara o, si el daño es excesivo, la célula recibe instrucciones de morir por muerte celular programada (apoptosis)

Fig. A.

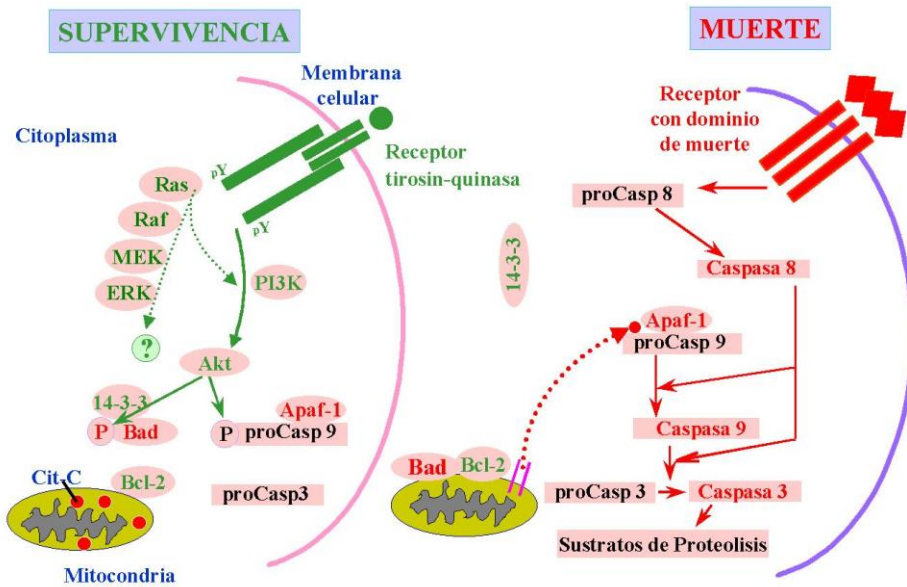


Fig. A. Esquema representativo del mecanismo central de apoptosis. En verde se representan las moléculas anti-apoptóticas y en rojo las pro-apoptóticas

El primer punto se presenta en G1/S en este momento se definen las condiciones adecuadas para la replicación, etapa que se denomina G1 – “arrest”. Si existe un daño al ADN, los sistemas de reparación se activan, retrasando la progresión del ciclo; si el daño es irreparable, se activan las vías apoptóticas. Esto impide la replicación de células que tienen daños en el material genético como mutaciones o rompimientos cromosómicos. El segundo punto se presenta en G2/M, donde se establece si el proceso de replicación del ADN fue exitoso y en caso negativo se desencadenan eventos para eliminar estas células (G2-“delay”). Cuando se activan los procesos de reparación del ADN durante la replicación, la fase S avanza muy lentamente,

mientras que si se interfiere con los procesos mitóticos, suele presentarse una pausa en la metafase para prevenir una distribución asimétrica de los cromosomas.

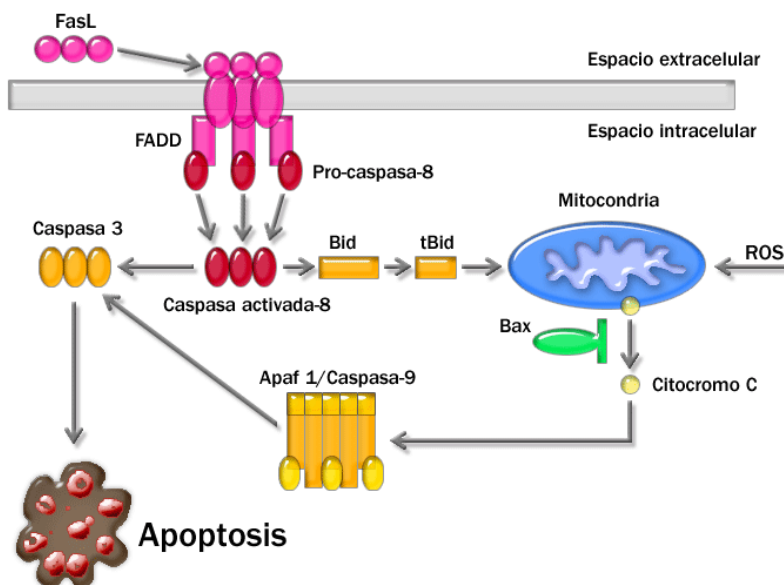


Fig. B. Fas o CD95 es un receptor proapoptótico y cuando se une a la molécula ligando Fas o L Fas, se forma un receptor complejo que induce la incorporación de una nueva proteína FADD. La interacción entre Fas activado y FADD, permite que la procaspasa 8 se una al complejo fas-FADD. La procaspasa 8 se divide inmediatamente para formar caspasa 8, que a su vez activa la caspasa 3, que desencadena la apoptosis.

Para funcionar adecuadamente, los puntos de control incluyen sensores de daño, como proteínas de la familia RAD, y traductores, las familias CHK cinasa. Las moléculas efectoras de los puntos de control difieren dependiendo de la etapa, en G1/S, la detención del ciclo celular depende principalmente por p53, que induce al inhibidor del ciclo celular p21. La detención del ciclo de la célula por el punto de control G2/M implica mecanismos dependientes e independientes de p53. No obstante, la prolongación del tránsito en el ciclo celular contribuye a la supresión del crecimiento celular (Kumar *et al.* 2005; McCollum *et al.* 2006). Para detectar algún tipo de daño en el ciclo celular se determinó la actividad de caspasa 3 y la técnica de TUNEL. Siendo el propósito de la tesis la evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad producida por efluentes hospitalarios sobre *Cyprinus carpio*.

3. JUSTIFICACIÓN

Los efluentes hospitalarios pueden contener diferentes compuestos químicos que afecten de manera indirecta a los ecosistemas acuáticos, tal como lo describen diferentes autores (Jolibois y Guerbet 2005; Gupta *et al.* 2009; Santos2010), y es esperable que la mezcla compleja de compuestos pueda presentar efectos citotóxicos y/o genotóxicos sobre los organismos que la habitan, aunque dichos compuestos se encuentren en pequeñas cantidades.

Existe evidencia que demuestra, el riesgo generado por una fracción de efluentes hospitalarios para los ecosistemas, siendo la inducción de genotoxicidad un riesgo relativamente bajo. Aún con las bajas concentraciones de compuestos tóxicos detectadas en los efluentes se ha demostrado un efecto mutagénico, lo que indica la importancia del monitoreo de este tipo de efluentes.

Debido a lo anterior, es de gran importancia realizar estudios citotóxicos y genotóxicos para evaluar el impacto que los efluentes hospitalarios puede producir al ambiente. El presente trabajo puede ser una referencia para orientar en la elaboración de normas y/o procedimientos para la correcta disposición de los vertidores de aguas residuales, así mismo, permitirá contar con mayor información acerca del perfil de genotoxicidad y citotoxicidad de efluentes hospitalarios y determinar su posible impacto ambiental.

4. HIPÓTESIS

El agua residual de la unidad de medicina familiar del IMSS No. 222 del Estado de México, es una mezcla compleja que puede inducir efectos genotóxicos y citotóxicos en los organismos *Cyprinus carpio*.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad producida por efluentes de agua residual de la unidad de medicina familiar del IMSS No. 222 del Estado de México

5.2. Específicos

- Evaluar el daño genotóxico producido por el Efluente Hospitalario, mediante la determinación del daño al ADN en la especie *Cyprinus carpio*, empleando el ensayo de micronúcleos (MN); y la determinación del porcentaje de células apoptóticas y, en las diferentes fases del ciclo celular (G1/G0, G2 y S), en TUNEL
- Determinar el efecto citotóxico producido por la mezcla del efluente hospitalario en sangre de *Cyprinus carpio*, mediante la actividad de caspasa 3 y LDH como marcador bioquímico inespecífico.

6. METODOLOGÍA

6.1. Muestreo

Se tomaron 20 Litros de muestra de aguas residuales no tratadas de la unidad de medicina familiar del IMSS No. 222 del Estado de México, en base a la Norma Mexicana NMX-AA-003-1980, Muestreo de Aguas Residuales. Las muestras se recolectaron en garrafones de polietileno, lavados previamente con detergente no iónico y enjuagada con agua desionizada antes del muestreo y cerradas herméticamente. Posterior a la recolección las muestras se almacenaron a 4° C.

6.2. Análisis Físicoquímico y Microbiológico

El método de prueba para la estimación de la densidad microbiana por la Técnica del Número más Probable (NMP/20 ml), se determinaron Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF). En la prueba presuntiva la muestra se inoculo en tubos con campana de Durham, para ver la fermentación y se incubaron por 48 hrs. a 37°C. En la prueba presuntiva, se homogenizó la muestra y se transfirieron volúmenes de 10 ml, 1 ml y 0.1 ml a cada uno de los nueve tubos que contenían campana de Fermentación (Durham) y Caldo de MacConkey (BBL, Cockeysville, MD, EE.UU); los tubos se incubaron a 35°C ± 2°C, durante 48 ± 2 horas, y los que presentaron formación de gas, fueron confirmados en Agar eosina azul de metileno (BBL, Cockeysville, MD, EE.UU.) incubados a 35°C ± 2°C por 48 ± 2 horas para CT, y en Caldo MacConkey incubados a 44°C ± 2°C por 48 ± 2 horas para CF.

El análisis físicoquímico comprendió el pH (NMX-AA-008-SCFI-2011), la dureza total, Cloruros totales, contenido Fluoruros, contenido de Cloro Residual (p.p.m., ion selectivo) de acuerdo con los métodos estándar para el análisis de agua y aguas residuales (APHA y AWWA, <http://www.standardmethods.org/store/>). Y la determinación de los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal (NOM-002-SEMARNAT-1996)

6.3. Organismos de prueba (*Cyprinus carpio*)

Los organismos de prueba se obtuvieron del centro acuícola carpícola de Tiacaque, Estado de México y se trasladaron al Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México. Para la aclimatación y mantenimiento del organismo de prueba se distribuyeron en peceras de vidrio de 160 L de capacidad en un medio sintético (174 mg/L de NaHCO_3 , 120 mg/L de MgSO_4 , 8 mg/L de KCl y 120 mg/L $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) de pH 7.5-8.5, a temperatura ambiente, con aireación constante, fotoperiodos de luz / oscuridad 21:12 y alimentados cada tercer día con Purina^{MR} para peces.

6.4. Preparación del medio sintético

Se disolvieron en 2.85 L de agua destilada (o desionizada) 120 mg/L de MgSO_4 , 174 mg/L de NaHCO_3 , 8 mg/L de KCl en el orden descrito. Por otra parte se agregaron 120 mg/L de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 150 mL de agua destilada (o desionizada) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se colocaron la solución a agitación hasta que el CaSO_4 estuviera completamente disuelto; se adicionaron a los 2.85 L de solución preparados con anterioridad y se mezclaron perfectamente. Para valorar la calidad del agua reconstituida, se colocaron 10 carpas juveniles en una muestra durante 24 h; si al término de este tiempo no se registraron muertes, el agua fue utilizada.

6.5. Caracterización fisicoquímica del medio sintético

El medio sintético se caracterizó a través de la determinación del pH que se midió utilizando un potenciómetro de electrodo de vidrio, del oxígeno disuelto (medido a través de un oxímetro), y de la conductividad.

6.6. Ensayo de Toxicidad Aguda

La concentración letal media (CL50) de la exposición al efluente hospitalario, se determinó en cinco grupos enriquecidos con concentraciones de 3.0, 6.0, 7.0, y 8.0 %, se diluyó en agua sintética descrita anteriormente. Se realizaron cinco repeticiones utilizando 10 organismos

seleccionados al azar de la población. A las 96 h la CL50 de las aguas residuales del hospital y sus límites de confianza del 95% ($p < 0,05$) fueron estimadas por análisis Probit (EPA programa de análisis Probit v7.5) (EPA, 2013).

6.7. Ensayo de Toxicidad Subletal

Se emplearon cinco peceras de vidrio de 40 L de capacidad; por cada sistema de prueba (incluyendo al testigo) se colocaron seis organismos. Los grupos fueron expuestos a $1/10^a$ de la CL_{50} (LOAEL), es decir 0.54 porciento del efluente hospitalario diluido en 35 L del medio sintético a temperatura ambiente, con aireación constante. El grupo testigo se mantuvo en condiciones de forma idéntica pero sólo con medio sintético. El tiempo de exposición fue de 0, 24, 48, 72 y 96 horas.

6.8. Determinación de citotoxicidad y genotoxicidad

Para el estudio de genotoxicidad y citotoxicidad, se emplearon peceras de vidrio de 40 L de capacidad, que contenían 5.49 mL de efluente de la unidad de medicina familiar del IMSS No. 222; en cada sistema de prueba (incluyendo al testigo) se colocaron seis organismos. El tiempo de exposición fue de 0, 24, 48, 72 y 96 horas; después del cual, se anestesiaron a las carpas utilizando aceite de clavo al 5%. Posteriormente, se tomaron muestras sanguíneas de la vena caudal; por cada 100 μ L de sangre se adicionaron 400 μ L de buffer salino de fosfatos (PBS). Con las muestras de sangre de cada individuo se realizaron pruebas para determinar genotoxicidad (micronúcleos y TÚNEL) y citotoxicidad (Caspasas y LDH). El ensayo se realizó por triplicado.

6.9. Evaluación de la Genotoxicidad

6.9.1. Micronúcleos (MN)

Los micronúcleos (MN), es una técnica citogenética que permite detectar el daño en el ADN, así como procesos de reparación fallidos en el ADN de células post-mitóticas. El primer paso para esta técnica fue obtener un frotis de la muestra sanguínea, después se fijó con etanol puro durante 20 min. Posteriormente se tiñó con una solución de Giemsa al 10% durante 9 min. Se observaron

en un microscopio de luz un total de 1000 eritrocitos o hemocitos por muestra, la frecuencia de micronúcleos en las células (MN) se expresaron como número por mil (%) MN. Los criterios para determinar la presencia de micronúcleos se establecieron con la no conexión de pequeños núcleos de forma circular u ovoide con el núcleo principal, con una área aproximada de una tercera parte. Las células que presentaron las características anteriores y que mostraron el mismo patrón de tinción se consideraron como micronúcleos.

6.9.2. TUNEL

La apoptosis de eritrocitos obtenidos de los peces expuestos se demostró mediante la técnica denominada TUNEL, utilizando el kit ApopTag Fluorescein S7110 (CHEMICON).

Se tomaron 300 μL de las células en la solución conservadora y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min a 4°C. El botón se resuspendió en 50 μL de la solución de montaje. Se tomó 1 μL de la suspensión celular y se colocó en un portaobjeto con polilisina, se secó la preparación a 60°C durante 5 minutos. Una vez seco el material celular, se fijó con acetona fría por 10 min y se hidrató colocando las laminillas en xileno, alcohol absoluto, alcohol al 96, al 80, al 70, al 60, al 50 % y finalmente en agua por 30 seg., en cada solución. Una vez que las células se hidrataron, se realizó un pre tratamiento con proteinasa K por 10 min y se lavó la muestra tres veces con PBS durante 10 min, se eliminó el exceso del líquido; se adicionaron 60 μL del amortiguador de equilibrio del kit y se dejó reposar por 10 min. La solución de la enzima TdT se adicionó a las células (65 μL por muestra) y se incubaron en una cámara húmeda por 1 h a 37°C. Se detuvo la reacción con un amortiguador de lavado por 10 min a temperatura ambiente. Se lavaron las muestras tres veces con PBS durante 1 min y se agregaron el conjugado anti-FITC (65 μL por muestra) para el marcaje de las células apoptóticas, incubándose en una cámara húmeda por 30 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Se lavó la muestra 4 veces con PBS por 2 min a temperatura ambiente. Finalmente se contrastó el marcaje con IP (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia con un sistema de captura de Media Cybernetics y un filtro de 450-490 nm. La apoptosis se expresó como el número de células TUNEL positivas por cada 100 células

6.10. Evaluación de la citotoxicidad

6.10.1. Caspasas

Para la determinación de la actividad de caspasa-3 se utilizó un kit de ensayo colorimétrico (CaspACE™ Promega) cuyo sustrato se une a la enzima liberando p-nitroanilina (pNA). Se preparó un blanco con 32 μL del amortiguador de caspasas, 2 μL de DMSO, 10 μL DTT y 54 μL de agua desionizada; para el grupo testigo y el grupo tratado con efluente hospitalario se utilizaron 32 μL de amortiguador de caspasas, 2 μL de DMSO, 10 μL DDT, 20 μL de extracto celular y 34 μL de agua desionizada; el testigo positivo utilizó 32 μL de amortiguador de caspasas, 2 μL de DMSO, 10 μL DDT, 20 μL de extracto celular y 34 μL de agua desionizada; para la apoptosis inhibida se utilizó 32 μL de amortiguador de caspasas, 2 μL de DMSO, 10 μL DDT, 20 μL de extracto celular con apoptosis inhibida y 34 μL de agua desionizada.

6.10.2. Lactato Deshidrogenasa (LDH)

El Lactato Deshidrogenasa (LDH), se determinó en suero, mediante el método cinético enzimático, en el que la LDH cataliza la oxidación reversible de L-lactato a piruvato con la reducción concurrente de β-nicotinamín adenín dinucleótido (NAD⁺) a β-nicotinamín adenín dinucleótido reducido (NADH). La tasa en el incremento de absorbancia (340 nm) en la mezcla de reacción se debe a la formación de NADH, la cual es proporcional a la actividad de LDH.

6.11. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis no paramétrico de análisis de varianza (1 vía), empleando el de Kruskal-Wallis, con un intervalo de confianza de $p < 0.05$.

CAPÍTULO II. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Rv: Submission Confirmation

08/10/2013

Environmental Pollution

Title: Cytotoxic, Genotoxic and apoptotic effect in *Cyprinus carpio* exposed to hospital effluents.

Authors: Corina G Olvera-Nestor; Enrique Morales Avila, Ph.D.; Leobardo M Gómez-Olivan, Ph.D.; Marcela Galár-Martinez, Ph.D.; Sandra Garcia-Medina, Ph.D.; Nadia Neri-Cruz, Ms.C.

Article Type: Full Paper (max. 5000 words)

Dear Dr. Enrique Morales Avila,

Your submission entitled "Cytotoxic, Genotoxic and apoptotic effect in *Cyprinus carpio* exposed to hospital effluents." has been received by Environmental Pollution.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/envpol/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Environmental Pollution

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Cytotoxic, Genotoxic and apoptotic effect in *Cyprinus carpio* exposed to hospital effluents.

Olvera-Nestor Corina G.¹, Morales-Avila Enrique¹, Gómez-Olivan Leobardo M.¹, Galár-Martínez Marcela², García-Medina Sandra²; Neri-Cruz Nadia¹.

¹ Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, MEXICO

² Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, MEXICO

*CORRESPONDENCE TO:

Enrique Morales-Avila, Ph.D.

Facultad de Química

Universidad Autónoma del Estado de México

Paseo Tollocan esq Paseo Colón S/N.

Toluca, Estado de México.

C.P. 50120, México.

Tel. + (52) (722) 2 17 41 20

Fax. + (52) (722) 2 17 38 90

e-mail: enrimorafm@yahoo.com.mx

emoralesav@uaemex.mx

Abstract

Emerging contaminants include a wide variety of compounds as well as metabolites, frequently found as mixtures in complex environmental matrices. Hospital wastewaters are an important source of emerging contaminants. The environmental impact associated with their occurrence is still unknown, recent studies emphasize the intrinsic toxicity of hospital effluents, besides describing the importance of evaluating the effects of mixtures rather than individual environmental risk, due to possible interactions with notable side effects. The aim of the present study is an attempt to characterize *Cyprinus carpio* biomarkers related to exposure of a mixture of emerging contaminants delivered in hospital wastewater. Results show a LC_{50} of hospital wastewater of 5.49 % at 96 h. Sublethal toxicity assays show that cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects increase when fish are exposed to a particular hospital wastewater, the effects of exposure show an ecotoxic risk for aquatic fauna and flora in the final fate of contaminants.

Key Words: Genotoxicity; Cytotoxicity; Emergent contaminants; hospital effluents.

Research Highlights

We characterized fish biomarkers related to hospital wastewater exposure. We identify the LC_{50} of *Cyprinus carpio* exposed to hospital wastewater. We examine changes in the cytotoxic, genotoxic and apoptosis effects in aquatic organisms. Increasing information of toxic effects will decrease the ecotoxic risk for aquatic fauna and flora exposed to regular hospital wastewater.

Capsule

We identify the ecotoxic risk of hospital wastewater release; exposure induces cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects as a mechanism of potential damage to aquatic wild life.

Introduction

Emerging contaminants have been broadly defined in several ways, as any synthetic or naturally occurring chemicals or any microorganism that are released in the environment and cause known or suspected adverse ecological and (or) human health and which currently no regulation are established for their monitoring. A wide range of substances are characterized as emerging contaminants, including pharmaceutical and personal care products, illicit drugs and abuse drugs, perfluorochemicals, hormones, steroids quaternary ammonium compounds, polar pesticides, veterinary products, food additives, engineered nanomaterials, etc. (Lapworth et al., 2012).

It is established that these pollutants are introduced to the environment from a variety of sources, including effluents from municipal wastewater, industrial waste, treatment plants and hospital effluents. Some contaminants are more sources specific; hospital wastewater are an important source of emerging contaminants, compared with urban wastewater, producing mainly contaminants as drug residues and its metabolites, chemical reactants, high concentration of chlorine and disinfectants, detergents, developers, radiographic fixing agents including organohalogen compounds, dyes, patient excretions, microorganisms, etc. (Escher et al., 2011; Lapworth et al., 2012; Verlicchi et al., 2012).

The hospital effluents are generally discharged into urban drainage networks, generally without prior treatment in the same way as classical domestic wastewater. The most frequently group of emerging contaminants are pharmaceuticals. Actually has been detected a increasing concentration of pharmaceuticals in surface water, ground waters and drinking water (Carrara et al., 2007; Fawell et al., 2012; Jardim et al., 2012; Jelic et al., 2012).

Recent studies emphasize the intrinsic toxicity of hospital effluents (5 to 15 times greater than an urban effluent) and its effect in the receiving environment especially surface water as rivers and lakes (Boillot et al., 2008; Leprat et al., 1999). Different studies with single pharmaceutical compounds shows no or moderate environmental risk, however, recent studies have been

described that mixtures of pharmaceuticals, its metabolites and diverse pollutants may interact or show concentration additively with notable significant mixture side effects on algae, aquatic arthropods and fish populations (Emmanuel et al., 2005; Escher et al., 2011).

In agreement with these studies, we can assume that the toxicity of a very complex mixture is governed not only for the specific mode of action of a single component. At the concentrations at which acute toxicity usually occurs, the toxicity of a single pharmaceutical will be predominantly due to the specific mode of toxic action. However, in mixtures the concentration of each single component decreases, while the number of components with various different specific modes of toxic action increases. The toxicity of chemical mixtures is relatively well understood through the concepts of concentration addition and independent action, with synergism being acknowledged as only a rare occurrence. In accordance with international guides prospective risk assessment studies must take account the contribution of the “cocktail effects” of chemical mixtures at very low dose of the single substance in order to understand and to define effective measures to improve ecological status (ECETOC, 2001).

The hazardous potential of some substances found in hospital effluents include the disruption of physiological mechanisms in wildlife, diverse studies show evidence of toxicity in aquatic organisms exposed to wastewater, for example, it is clear that oxidative stress (OS) possess injuring potential and they realize it in living organisms, the OS could be produced due pro-oxidants contained in water, the formation of reactive oxygen species (ROS) and the imbalance produced in antioxidative enzyme systems (Almroth et al., 2008; Islas-Flores et al., 2013; Lushchak, V., 2009; Sturve et al., 2008). Additionally genotoxic and cytotoxic effects as main biomarkers in assessment of the pollution-related toxicity must be applied as bioindicators of acute and chronic health effects of pollution exposition.

The aim of the present study is an attempt to characterize fish biomarkers related to exposure of a mixture of emerging contaminants delivered in hospitals wastewater, using the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic effect tests.

Materials and methods

Sampling

Untreated wastewater samples of twenty liters were taken twice in 6 months from medical center IMSS No. 222 in Mexico State (n=6), in according to the rules and regulations of the Official Mexican Norm NMX-AA-003-1980 Mexican for wastewater sampling. The samples were collected in clean polythene bottles, washed with non-ionic detergents and rinsed with deionised water before sampling and tightly sealed after collection and were stored at 4 °C until tested.

Microbiological and physicochemical properties of wastewater.

Microbial analysis consisted in total coliforms (TC) and fecal coliforms (FC) determination using the most probable number (MPN) method (APHA, 1989). In the presumptive test for coliforms, three 10-mL, three 1-mL, and three 0.1-mL volumes of the appropriate dilution of the water sample were inoculated in nine fermentation tubes with a Durham vial in MacConkey broth (BBL, Cockeysville, MD, USA). The inoculated tubes were incubated for 48 h at 37°C, and those presenting gas and acid were confirmed in Levine eosin methylene blue agar (BBL, Cockeysville, MD, USA) at 37°C for TC and in MacConkey broth with a Durham vial at 44°C for 24 h for FC. The physicochemical tests included the determination of pH (NMX-AA-008-SCFI-2011) total hardness, total chloride and fluoride content (ppm., ion selective electrode), and residual free chlorine in agreement with the Standard Methods For Examination Of Water And Wastewater (APHA and AWWA, <http://www.standardmethods.org/store/>).

Fish treatment and experimental setup

Juvenile *Cyprinus carpius* (weighing 50 ± 8 g) were obtained from the aquatic carp center Tiacaque, Mexico State and transported to the Toxicology Laboratory in the Faculty of Chemistry, Autonomous University of Mexico State. Organisms were acclimatized and kept in different fish glass tanks with capacity of 160 l, with a 7.5-8.5 pH synthetic habitat (174 mg/L de NaHCO_3 , 120 mg/L de MgSO_4 , 8 mg/L de KCl y 120 mg/L $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (total alkalinity $17.8 \pm$

7.3 mg/L, total hardness 18.7 ± 0.6 mg/L) at room temperature with constant air flow, natural light/dark photoperiods and fed *at libitum* with Pedregal SilverTM for fish.

Acute Toxicity Assay

The median lethal concentration (LC₅₀) of hospital effluent exposition was determined in five groups enriched with perceptual concentrations of 3.0, 6.0, 7.0, and 8.0, diluted in synthetic water described previously. Five replicates of the assay were performed with 10 carp randomly selected from the stock, the 96-h LC₅₀ of hospital waste water and its 95% confidence limits ($p < 0.05$) were estimated by Probit analysis (EPA Probit analysis program v7.5) (EPA, 2013).

Sublethal Toxicity Assay

The fishes were divided into five groups; each group was placed in a separate 40 L glass aquarium (6 fish per aquaria). The groups were exposed to 1/10th of LC₅₀ (LOAEL), corresponding to perceptual concentration of 0.54 of wastewater diluted in 35 L of synthetic habitat with additional air bubbling and temperature of 25 °C, control fish group were kept in identically conditions but only with synthetic medium. Fish showed no visual signs of ill health or injury during the exposure period. The exposition times were 0, 24, 48, 72 and 96 hours, after these periods fishes were anesthetized with 5% clove oil. Blood samples were taken from the caudal vein; 400 µL of phosphate buffered saline (PBS) will be added per each 100 blood µL and stored until perform tests.

Biochemical assays

Lactate dehydrogenase (LDH)

Lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27), which is a soluble cytosolic enzyme present in most eukaryotic cells, releases in extracellular space upon cell death due to damage of plasma membrane, the increase of the LDH activity is proportional to cellular cytotoxicity. LDH was determined in serum by kinetic enzymatic method, in which the LDH catalyzes the reversible

oxidation from L-lactate to pyruvate with the concurrent reduction of β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) to β -nicotinamide adenine dinucleotide reduce (NADH).

Cytotoxicity assay

Caspase 3

The activity of caspase 3 was measured by the colorimetric assay with CaspACE assay system (Promega, Madison, WI). Briefly, after exposition to effluents (0, 24, 48, 72 and 96 h), blood samples were collected and 20 μL of extract was washed twice with ice-cold PBS and resuspended in cell lysis buffer. Cell lysates (100 μg of protein) were incubated with colorimetric substrate, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-*p*-nitroanilide. The reaction mixtures were incubated at 37 °C for 1-h. The release of *p*-nitroanilide from acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-*p*-nitroanilide was measured at 405 nm using a spectrophotometer. The samples of control group was treated as same as exposed groups. Results are expressed as percentage of activity respect to control group.

Genotoxicity assay

Micronucleus

Micronucleus (MN) test were performed for detect chromosome loss and chromosome breakage, it also detects failure in DNA repairing processes of post-mitotic cells. Blood samples were obtained from each fish at the times indicated in previous section. A drop of blood was placed on a slide and a smear was prepared. The dried smear was fixed with methanol during 10 minutes, followed by 10 % Giemsa (w/v) staining for 9 minutes and finally mounted in resin. A total of 2000 erythrocytes, 500 per slide for each individual were examined in a light microscope under 1000 X magnification. Micronuclei were scored according to the following criteria: 1. the micronuclei were round; 2. they had a diameter of about 1/5 to 1/40 of the main nucleus, and 3. they were stained deep purple. Coded and randomized slides were scored, the number of micronucleated cells were expressed per 100 cells (% MN) observed.

Apoptotic response to hospital effluent exposition

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

The assay was carried out following the manufacturer's instructions indicated in the ApopTag Fluorescein S7110 kit. Lymphocytes (300 μ L) were centrifuged at 800 *g* for 5 min at 4 °C and resuspended in 50 μ L of the mounting solution; subsequently, 1 mL of the cell suspension was placed on a slide with poly-l-lysine, dried at 60 °C for 5 min, fixed with cold acetone for 10 min, and then hydrated by successive changes of xylene, ethanol (from 100% to 50%), and water. Next, a treatment with proteinase K (20 μ g/mL) was made for 10 min, followed by rinsing the cells in PBS, adding the equilibrium buffer (60 μ L), and incubating the lymphocytes with 65 μ L of the enzyme TdT at 37 °C for 60 min. Finally, the cells were rinsed again in PBS before adding the conjugate anti-FITC and maintained for 30 min at room temperature in order to identify cells in apoptosis. Lymphocytes were then rinsed with PBS, stained with PI (1.5 μ g/mL), and observed under a fluorescent microscope (Zeiss) equipped with a digital camera (ZWS-47DE). In our assay, we included a negative control group of cells treated as described before but without the addition of TdT, as well as a positive control sample treated with lymphocytes which had DNase I (1 μ g/mL).

Slides were observed in a fluorescence microscope with a Media Cybernetics capture system and a 450-490 nm filter. The rate of apoptosis was expressed as the percentage of TUNEL-positive cells in 100 cells/sample. Statistic evaluation of TUNEL assay was made by applying the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn multiple comparison tests.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E. from three independent experiments ($n = 5$) and were analyzed with one-way analysis of variance. Significant difference was accepted at $p < 0.05$.

Results

Microbiological and physicochemical properties of wastewater.

Microbiological and physicochemical there was no significant difference in recollected samples, total and faecal coliforms were found with a NMP (100-mL) less than 1.1 organisms. Physicochemical results are present as mean values in table number 1.

Acute toxicity

The LC₅₀ of hospital wastewater, expressed as perceptual concentration, was 5.49 % at 96 h, with a 95% confidence interval. The X² linear adjustment test was not significant ($p < 0.05$).

Subacute toxicity studies

We focused the *in vivo* studies in cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects as responses of hospital effluent exposition. In case of cytotoxic damage, the LDH activities in blood fish were determined as a function of the exposition time, the increases in serum activities with statistical significant difference respect to initial time and control group were observed at 24, 48 and 72 hours afterward a significant decrease were observed 96 hours post exposure initiation (Figure 1).

The analysis of Caspase-3 activity in erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to hospital waste water showed a significant difference respect to control group, with an increase between 2 - 3 times higher at 24, 48, 72 y 96 hours after starting exposition. No significant difference was observed at time cero respect to control group (Figure 2).

Apoptosis could be induced by a variety of stimuli, including environmental stresses, TUNEL-positive cells were identified by their red stained nuclei, exposition to hospital waste water showed an increase of 40 % in apoptotic red blood cells at 24 hour after exposition, maintained in an interval between 20 to 35 % until the last sample, taken at 96 hours of exposition. Positive relationship was observed using a Pearson correlation analysis between caspase-3 activity and apoptotic response (Pearson's $r = 0.89$; $r^2 = 0.73$) (Figure 3 and 4).

Micronuclei analysis shows a significant increase in 2.5 times more respect to control group and time zero at 48 hour after initiated exposition (Figure 5). The analysis of the baseline in micronuclei frequency shows a mean value of 0.88 per 2000 erythrocytes in which is in agreement with Buschini et al. (2004) and Llorente et al., (2002), however a significant difference in micronuclei baseline had been reported in *Cyprinus carpio* species by different authors, that can be related to different biotic factors such as age, sex, genetic make-up, conditions of treatments or different scoring criteria (Bolognesi et al., 2011; Grisolia et al., 2001; Gustavino et al., 2001; Kim et al., 2006).

Discussion

Recently studies have demonstrated the intrinsic toxicity in hospital wastewater; hospitals generate large volumes of effluents containing specific substances, the drug consumption seem to be the predominant factor of ecotoxicology risk, however its mixture with detergents, chemical agents, diagnosis agents, pathogens, etc. and its interactions must be taken into account (Boillot et al., 2008; Escher et al, 20011; Orias et al., 2013; Ort et al., 2012; Pauwels et al., 2006).

The effects and ecotoxicology repercussions of the amounts of chemical substances contained in hospital effluents are unknown and biodegradability is more the exception than the rule; turbidity, water shading and water depth, as well as the seasonal changes in sunlight exposure have a substantial impact on compound in surface waters. Also these substances may be sorbed by sediments and hence be no longer amenable to photochemical degradation (Kümmerer at al., 2001).

Microbial and physicochemical properties are an important ecotoxicological factor and provides information about many types of contaminants, in hospital wastewater samples there was no found a significant number of coliforms, due probably to the high intrinsic toxicity of water, a pH show a slightly alkaline trend, however pH is an important biological parameter due to most of aquatic organisms are adapted to an average pH and do not withstand abrupt changes,

furthermore could increase ionization of some compounds in the mixture improving uptake by aquatic organisms. The results show that total hardness, chloride, fluoride and residual free chlorine are not probably involved as important factors of toxicity.

Numerous types of damage have been documented in aquatic organisms experimentally exposed to toxicants and in populations sampled from polluted environments, specially related with emerging contaminants, including affections in redox condition and metabolism of oxidative species, (Gupta et al., 2009; Hoeger et al., 2004; Lushchak et al., 2011).

Lactate dehydrogenase in higher vertebrates has been shown to exist in the catalytic active form as a tetramer of four polypeptide chains, involved in anaerobic glycolysis responsible for anaerobic catalysis of lactate to pyruvate, is present in high concentrations in the cytoplasm of all cells. The elevation of LDH activity in serum or plasma is related to acute cell injury, due to the enzyme leakage through damaged cell membranes, additionally is expected a long-live increase production of LDH in cells under anaerobic conditions, until they become necrotic. Different studies reveal that in carp are possible to find five isozymes corresponding to muscle and heart subunits types in mammals (Frankel, 1987; Gronczewska et al., 2003). Nadal-Ginard (1978) determined that half-life of isozymes in mammals were related to tissue type, having a half-life in liver of 4.3 days, reflecting that rates of degradation plays an important role in concentration enzyme, however is important to note that biochemical adaptation strategies and phenotypic expression in tissues makes the balance in enzyme concentrations. Concerning to our experiment is evident that elevations in serum LDH responses to enzyme leakage through damage cells with posterior metabolism more than to anaerobic conditions that promote irreversible necrotic damage, additionally is possible to estimate that subacute expositions to contaminants of effluent could promote adaptive mechanisms in metabolic pathways in cells resulting in a regulation of LDH concentrations.

Caspases (cysteinyll aspartate-specific proteases) are a family of important signaling molecules with various tasks; its activation also is a marker for cellular damage, although the precise role in the initiation and progression of apoptosis is not clear. Caspases works activating downstream effectors and cleaving target proteins, which culminate in cell death, their involvement as a bioindicator of exposition to contaminants as widely studied, particularly Caspase-3 that is a point of convergence of the intrinsic apoptotic pathway initiated trough the mitochondria and serve as executioner Caspases of apoptosis, that directly lead to protein cleavage and cell death (Porter et al., 1999, Yamakawa et al., 2000).

The increases in Caspase-3 activity occurred 24 hours after initiated exposition, with an activity up-regulated at least of 3-fold in the following 48, 72 and 96 hours of exposition, consistent with different studies the induction of apoptosis is a rapid process that occurs within hours (Yu et al., 1998). Indeed exposition to hospital effluent induces apoptosis by activating apoptotic pathways with rapid induction of Caspase-3 activity. Due to DNA damage is not a unique feature of apoptosis, the determination of protease Caspse-3 provide a reliable method for confirm apoptosis, the increases in activity of Caspases correlates closely with apoptosis measure determined by TUNEL assay. Pearson analysis shows a positive correlation (0.89) between caspase-3 activity and apoptosis levels showing that, apoptosis is mediated and occurs through caspase-dependent pathways. Fan el al., (2005) reported that in mammals Caspase-dependent pathway is activated by a stimulus that results in activation of effectors Caspases, in fishes exposed to a complex mixture of contaminants, this stimuli could be mediated by intrinsic activity of compounds contained in the effluent or regulated by secondary molecules related to metabolisms or signals pathways, many of which end up as cell-membrane damage and eventually cell death.

Micronuclei test as an index of accumulated genetic damage during the lifespan of the red blood cells, is one of the most suitable techniques to identify integrated response to the complex mixture of contaminants, due to complex chemical characteristics of hospital wastewater could be

responsible of multiple effects at the organisms, fishes respond to toxic agents similar to higher vertebrates and can allow the assessment of substances that are potentially hazardous to humans. Fishes exposed to hospital wastewater shows a significant response at 48 and 72 hours of initiated treatment, after this time MN counts decrease to be compared with baseline counts. This variability could be explained for the metabolic capacity, DNA repair efficiency and defense mechanisms, process related directly to cell removal kinetics and/or development of adaptive mechanisms of tolerance to chemical stress that promote an increase in the replacement rate of dead or damaged cells to maintain normal physiology conditions or inhibition of nuclear division which is required for MN expression (Bolognesi et al., 2011; Obiakor et al., 2012; Palhares and Koppe, 2002;).

The hospitals are described as important sources of the introduction of contaminants in the aquatic environment, this knowledge are important for risk management and establishment of ambient regulations. The health-care waste involve the generation of large amounts of wastes, with a smaller proportion of components highly hazardous including emerging contaminants as pharmaceuticals, the data obtained from the present study clearly indicate that the hospital effluents from regional hospital in Toluca City that are directly discharged in municipal wastewater networks are highly cytotoxic, genotoxic, making necessary to acquire more information about the prevalence and levels of contaminant agents produced in hospitals, in order to make environmental control programs for the pre-treatment of water before releasing to municipal sewage systems.

Conclusions

The present study was made in order to obtain information of the ecotoxicological risk of hospital effluent exposition, in agreement with evaluating the effect of a complex mixture of contaminants more than the effects of substances that compose them, is important clarify that effluents characteristics has a considerable variability in the ecotoxicity, depending of substances presents,

period of time sampled, previous water treatment and daily hospital activities. Also is difficult to perform a clear explanation of the specific source or cytotoxic, genotoxic or apoptotic effect, due to the considerable number of phenomena responsible for ecotoxic effect of the effluent, including interactions as synergy and/or antagonism between the compounds presents in effluent, as well as the effect of the effluent's pH, hardness and chloride concentration on ecotoxicity. However we had demonstrate that cytotoxic, genotoxic and apoptotics effects increases when aquatic organisms (*Cyprinus carpio*) are exposed to a particular and regular hospital wastewater in Toluca, Mexico, the effects of exposition shows a ecotoxic risk for aquatic fauna and flora in last fate of contaminants. We emphasize the importance of identify and quantify the effects of specific contaminants as pharmaceuticals, disinfectants and surfactants in order to care of a ecotoxicological plan for prevent the take up and bioaccumulation in food chains.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the National Science and Technology Council (CONACYT) for research funding (Project reference number 151665).

References

[APHA] American Public Health Association, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. Washington (DC): American Public Health Association.

Almroth, B.C., Albertsson, E., Sturve, J., Förlin, L., 2008. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 370-378.

Boillot, C., Bazin, C., Tissot-Guerraz, F., Droguet, J., Perraud, M., Cetre, J.C., Trepo, D. and Perrodin, Y., 2008. Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Sci. Total Environ.* 403, 113-129.

Bolognesi, C. and Hayashi, M., 2011. Micronuclei assay in aquatic animals. *Mutagenesis.* 26(1), 205-213.

Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dorr, A. J. M. and Rizzoni, M., 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutat. Res.* 557, 119-129.

Carrara, C., Ptacek, C.J., Robertson, W.D., Blowes, D.W., Moncur, M.C., Sverko, E., Backus, S.I., 2007. Fate of pharmaceutical and trace organic compounds in three septic systems plumes, Ontario, Canada. *Environ. Sci. and Technol.* 42, 2805e2811.

ECETOC, 2001. Aquatic Toxicity of Mixtures. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, Belgium.

Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J.M., Vermande, P., 2005. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J. Hazard. Mater.* 117, 1-11.

Escher, B.I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., McArdell, C.S., 2011. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* 45, 75-92.

Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J., 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 37, 719-727.

Fawell, J., Nam, C., 2012. Emerging contaminants and the implications for drinking water. *Int. J. Water Resour. D.* 28(2), 247-263.

Frankel, J.S. 1987. Lactate dehydrogenase isozymes of the island barb, *Barbus oligolepis* (Cypriniformes, Teleostei): their characterization and ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 87B, 581-585.

Gupta, P., Mathur, N., Bhatnagar, P., Nagar, P., Srivastava, S., 2009. Genotoxicity evaluation of hospital wastewater. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1925-1932.

Grisolia, C.K. and Starling, F.L., 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat. Res.* 491, 39-44.

Gronczewska, J., Zietara, M.S., Biegniewska, A. and Skorkowski, E.F., 2003. Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring *Clupea harengus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 134B, 399-406.

Gupta, P., Mathur, N., Bhatnagar, P., Nagar, P., Srivastava, S., 2009. Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1925-1932.

Gustavino, B., Scornajenghi, K. A., Minissi, S. and Ciccotti, E., 2001 Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, Pisces) by X-rays and colchicines. *Mutat. Res.* 494, 151-159.

Hoeger, B., van den Heuvel, M.R., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R., 2004. Effects of treated sewage effluent on immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 70, 345-355.

<http://www.epa.gov/eerd/stat2.htm>. (June, 2013)

Islas-Flores, H., Gómez-Olivan, L.M., Galar-Martínez, M, Colín-Cruz, A, Neri-Cruz, N, García-Medina, S., 2013. Diclofenac-induced Oxidative Stres in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92, 32-38.

Jardim, W.F., Montgner, C.C., Pescara, I.C., Umbuzeiro, G.A., Di Dea, A.M., Eldridge, A.L., Sodré, F.F., 2012. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Sep. Purif. Technol.* 84(9), 3-8.

Jelic, A., Petrovic, M., Barceló, D., 2012, Pharmaceuticals in drinking water. *Emerging Organic Contaminants and Human Health The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer Link. 47-70.

Kim, I.-Y. and Hyun, C.-K., 2006, Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 288-297.

Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*. 45, 957-969.

Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012, Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.* 163, 287-303.

Leprat, P., 1999. Caractéristiques et impacts des rejets liquides hospitaliers. *Tech. Hosp.* 634, 56-7.

Llorente, M. T., Martos, A., Castano, A. 2002. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. *Ecotoxicology*. 11, 27-34.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13-30.

Nadal-Ginard, B., 1978. Regulation of lactate dehydrogenase levels in the mouse. *J. Biol. Chem.* 253(1), 170-177.

Orias, F., Perrodin, Y., 2013. Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: a review. *Sci Total Environ.* 1(454-455), 250-276

Ort, C., Lawrence, M.G., Reungoat, J., Eaglesham, G., Carter, S., Keller, J., 2010. Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. *Water Res.* 44, 605-615.

- Obiakor, M. O, Okonkwo, J.C., Nnabude, P. C., Ezeonyejiaku, C.D., 2012. Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as *In situ* Aquatic Pollution Biomarker: a Review. *J. Anim. Sci. Adv.* 2(1), 123-133.
- Palhares, D., Koppe, Grisolia, C., 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genet Mol Biol*, 25(3), 281-284
- Pauwels, B, Verstraete, W., 2006. The treatment of hospital wastewater: an appraisal. *J. Water Health.* 4, 405–16.
- Porter, A.G., Janicke, R.U., 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6(2), 99-104.
- Sturve, J., Almroth, B.C., Förlin, L., 2009. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 446-452.
- Verlicchi, P., Al-Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D., 2012. Hospital effluents: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 430, 109-118.
- Yamakawa, H., Ito, Y., Naganawa, T., Banno, Y., Nakashima, S., Yoshimura, S., Sawada, M., Nishimura, Y., Nozawa, Y., Sakai, N., 2000. Activation of caspase-9 and -3 during H₂O₂-induced apoptosis of PC12 cells independent of ceramide formation. *Neurol. Res.* 22(6), 556-564.
- Yu, R., Mandlekar, S., Harvey, K.J., Ucker, D.S., Tony-Kong, A-N. 1998. Chemopreventive Isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3 like protease activity. *Cancer Res.* 58, 402-408.

CONCLUSIONES

- ❖ El efluente de la unidad de medicina familiar del IMSS No. 222, genera daño al ADN en la especie *Cyprinus carpio*, manifestado en el incremento de la producción de MN y del porcentaje de células apoptóticas y en las diferentes fases del ciclo celular, por medio de la prueba de TUNEL, por lo que se concluye que este efluente genera genotoxicidad
- ❖ El efluente de la unidad de medicina familiar del IMSS No. 222, genera un incremento en la actividad de la Caspasa 3 y la enzima LDH en sangre de la especie *Cyprinus carpio*, por lo que se concluye que este efluente genera citotoxicidad
- ❖ La mezcla de componentes del efluente hospitalario de la unidad de medicina familiar del IMSS No. 222, genera un riesgo ecológico, por los componentes que contiene y las interacciones que existen entre ellos, manifestado por la ausencia de microorganismos por lo cual concluimos que este efluente provocando un daño mayor a la biota y medio ambiente

Table 1

Table 1. Physicochemical properties of hospital waste water from Toluca, México (p.p.m. mg/L)		
Test	Highest concentration	Threshold
pH	8.37	6.5 – 8.5
Total hardness	157.17	< 500
Total Chloride	223.44	< 250
Total Fluoride	0.171	0 – 15
Residual free chlorine	0.00	1.2 – 1.5
Arsenic	0.0162	0.75
Cadmium	< 0.0427	0.75
Cyanides	< 0.005	1.50
Cobre	< 0.204	15.0
Hexavalent Chromium	< 0.050	0.75
Fats and oils	25.4	75.0
Mercury	< 0.0021	0.015
Nickel	< 0.18	6.00
Plumb	< 0.1273	1.50
Zinc	< 0.211	9.00
Temperature	14.9	40.0

Figure captions

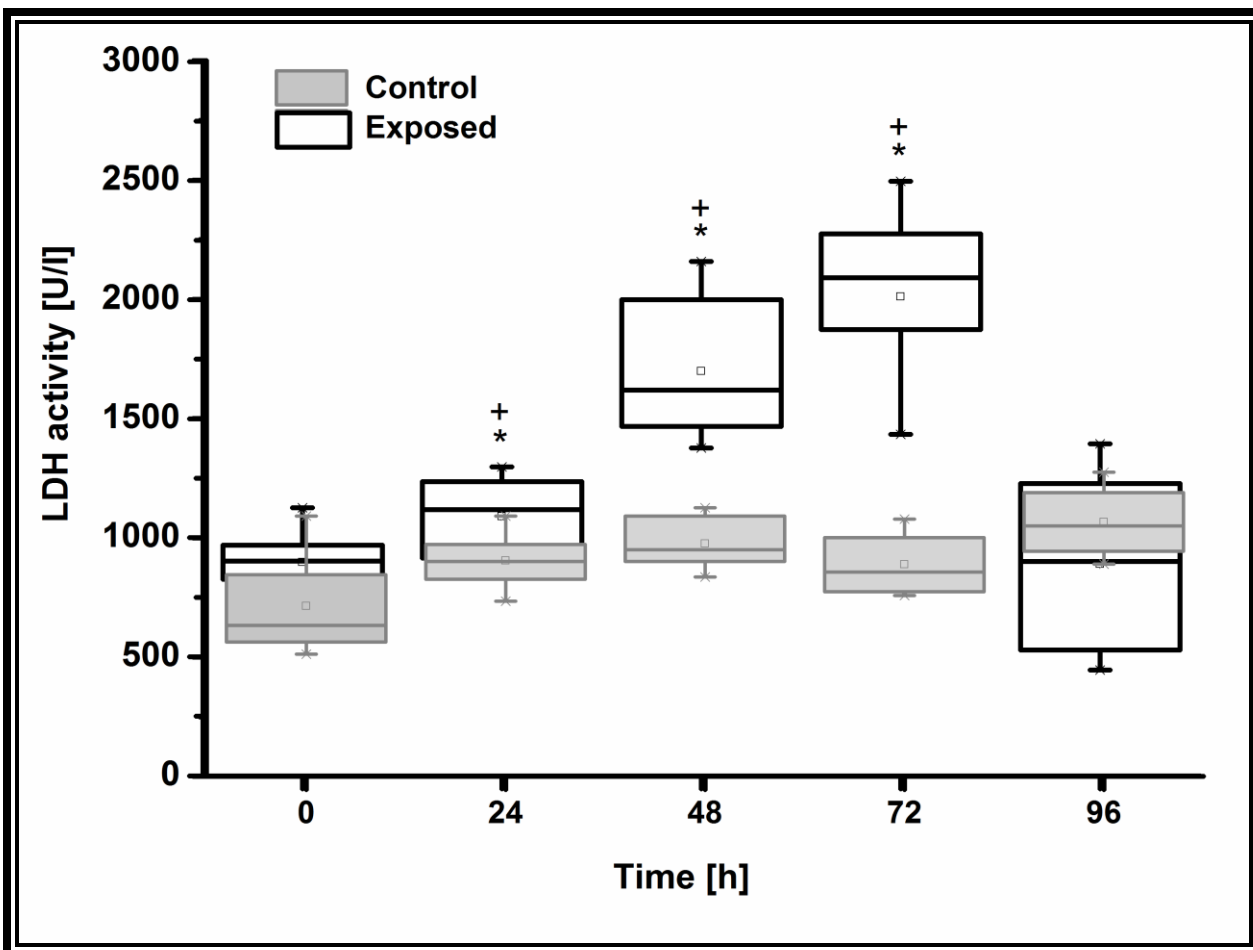


Figure 1. Lactate dehydrogenase activity in group and control after exposition (t = 0) to hospital effluent, significant difference between groups and respect to initial time are present at 24, 48 and 72 hours (at the 0.005 level of significance).

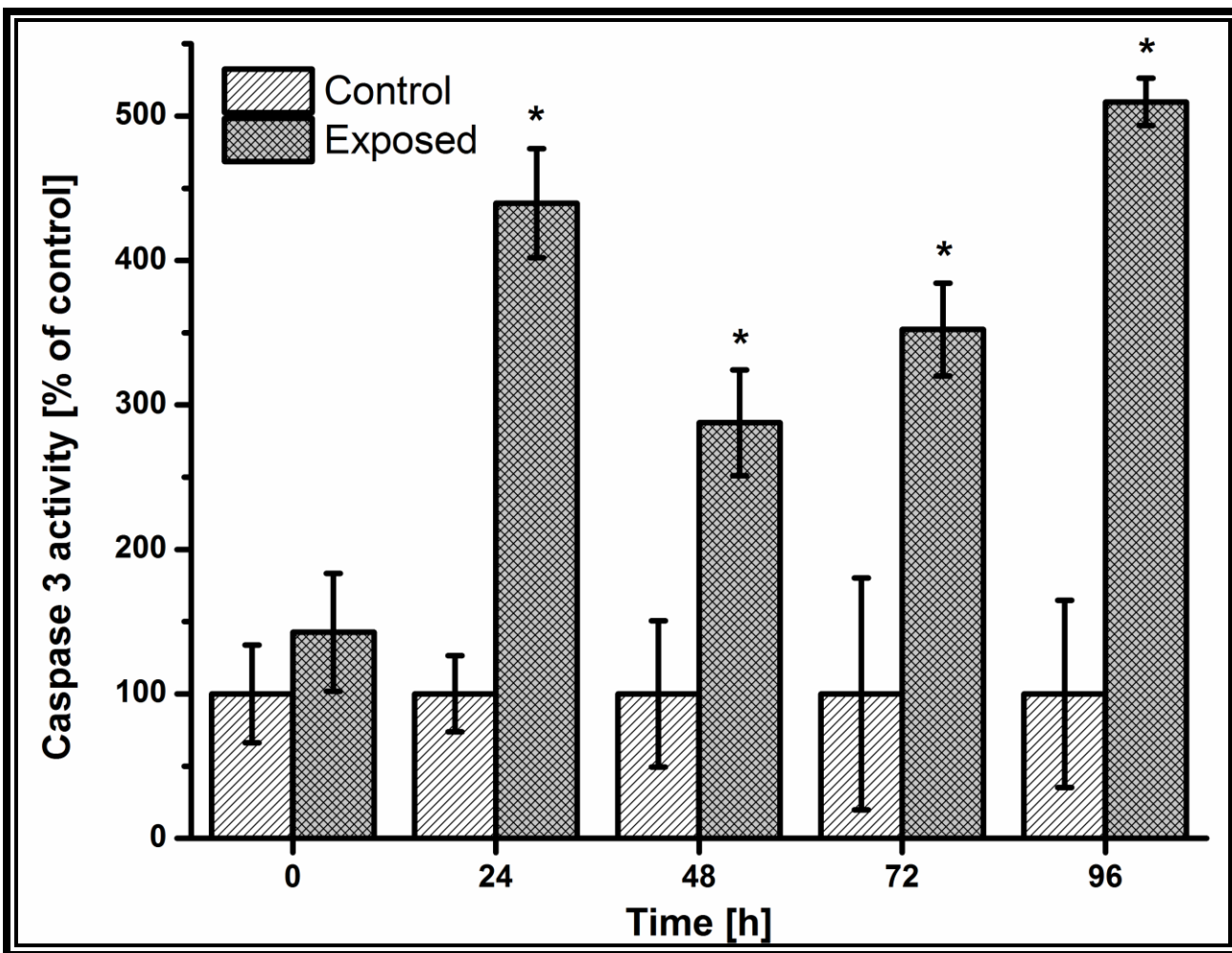


Figure 2. Caspase-3 activity measured in red blood cells. Significant differences ($P < 0.05$) are observed respect to control group 24 hours after exposition to hospital wastewater.

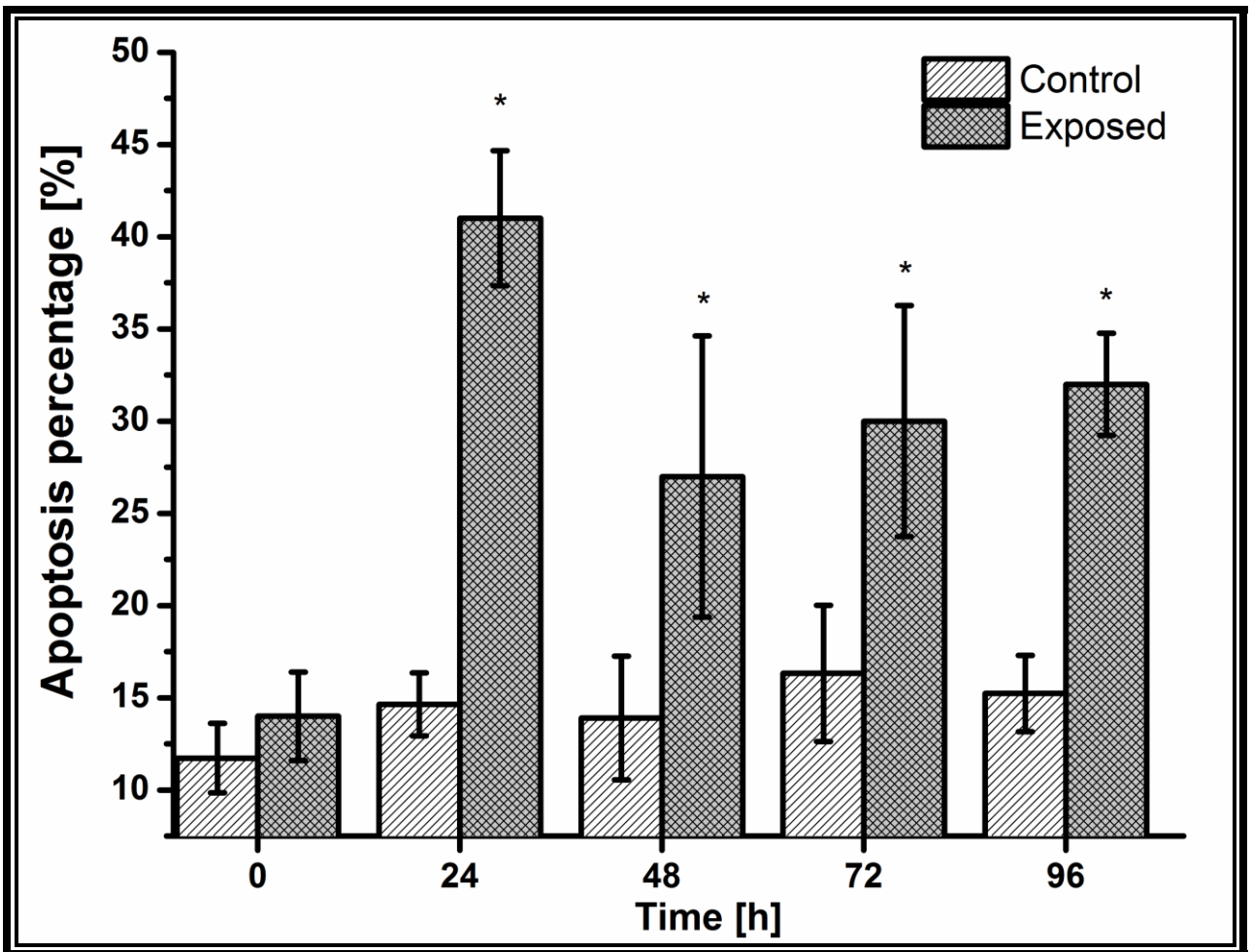


Figure 3. Percentage of apoptosis related to control group. Significant difference ($P < 0.05$) between control and exposed group after 24 hours of exposition to hospital wastewater. Apoptosis was expressed as the percentage of TUNEL-positive cells in 100 cells/sample.

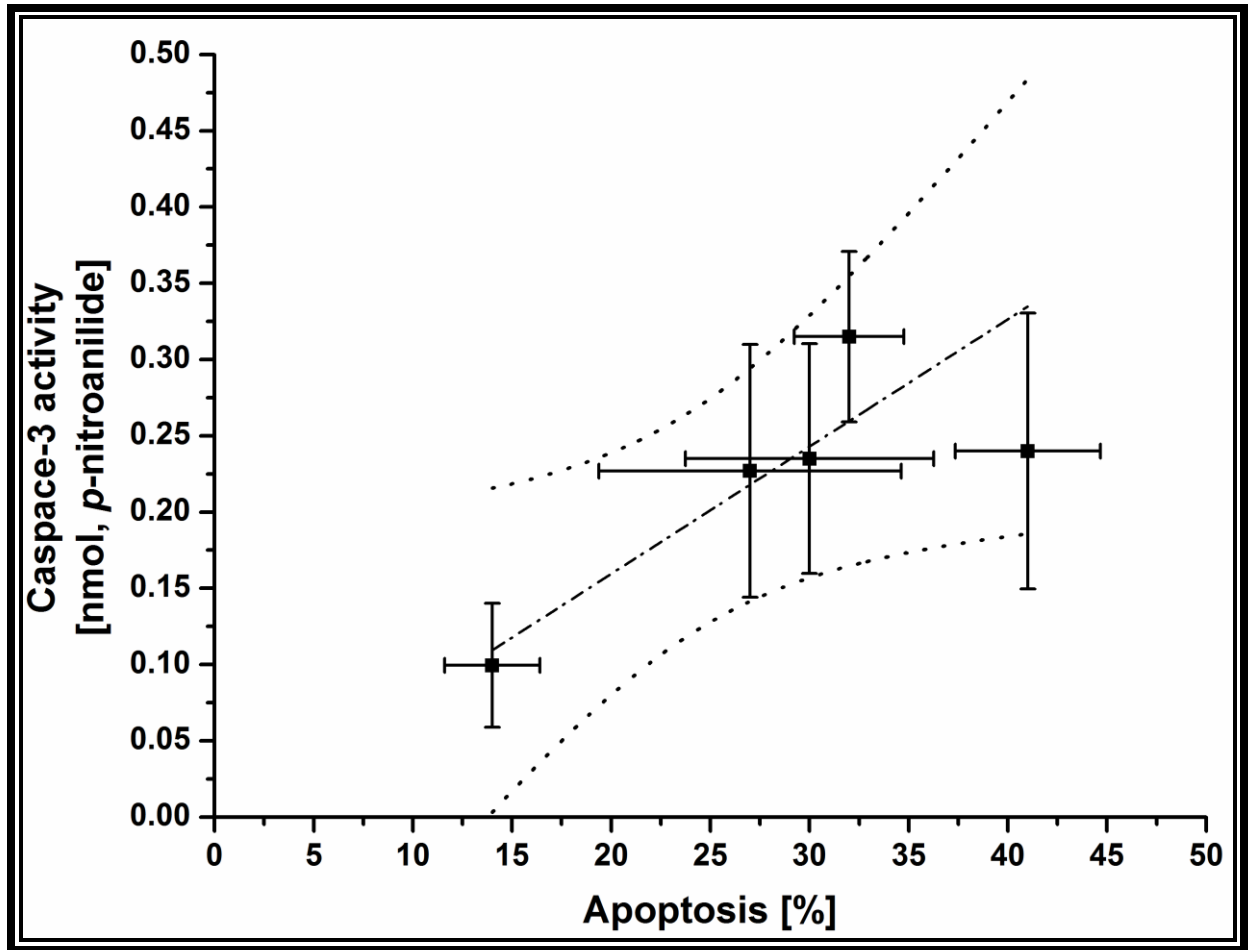


Figure 4. Relationship between caspase-3 activity and apoptosis, analyzed with Pearson's coefficient correlation showing the confidence interval at 0.95.

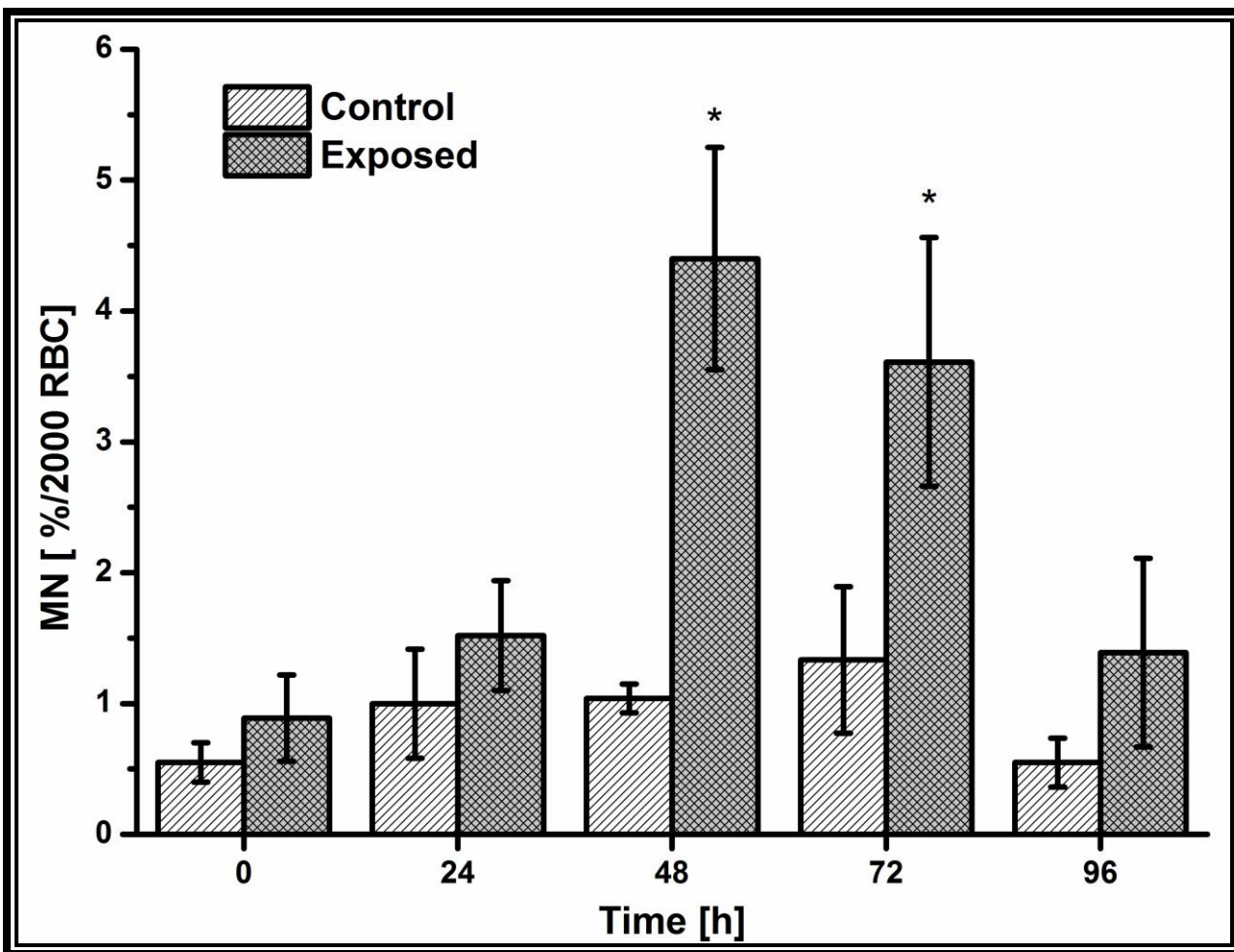


Figure 5. Micronucleus production due to hospital wastewater exposition. Significant difference ($P < 0.05$) between control and exposed group after 48 hours of exposition to hospital wastewater.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilera H. P., Zarza M. E., Sánchez M. R. La carpa y su cultivo. FONDEPESCA, SEPESCA. México. 1986:46
2. Andrews N. Disorders of iron metals. N. Engl. J. Med. 1999; 341: 1986-1995
3. Arencibia A. Daniel, Rosario F. Luis, Curveco S. Dayisell. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Retel. 2003
4. Baird C. Química ambiental. Editorial Reverté. México. 2001: 391-429
5. Barbouti A, Doulias P.T., Zhu B.Z., Frei B., y Galaris D. Intracellular Iron, but not Copper, Plays a Critical Role in Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage. Free Radic. Biol. Med. 2000; 131(4):490-498.
6. Barquero Q.M, Vargas R.R, Blanco S.R, Neurotoxicidad y enfermedades óseas provocadas por la contaminación con aluminio de soluciones de diálisis renal. Rev. costarric. cienc. méd. 2001; 22(3-4):499- 506.
7. Bihari N., Mićić M., Batel R., Zahn R. K. Flow cytometric detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast, Croatia. Aquatic Toxicol. 2003;64: 121-129
8. Bikovic-Popovic I. Effect of Hg on the survival of *Daphnia magna*. Wat. Sci. Tech. 2000;22:241-246
9. Boening, D. W. Ecological effects, transport and fate of mercury: a general review. Chemosph. 2000; 40(12):1335-1351.
10. Butterworth FM, Corkum LA, Guzmán-Rincón J. Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change: A Handbook. Environmental Science Research. 1995;(50).
11. Carriquiriborde R., Handy D. y Davies S. J. Physiological Modulation of Iron Metabolism in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed Low and High Iron Diets. J. Exp. Biol. 2004;207: 75-86
12. Castañe PM. Topalián ML. Cordero RP. Salibian A. Influencia de la especiación de los

- metales pesados en el medio acuático como determinante de toxicidad. *Rev. Toxi.* 2003; 20:13-18
13. Castillo N., Kawaguchi P., Madariaga B., Venegas R., Lecannelier F., Ocampo R., Castillo N. Factors that affect DNA content analysis by flow cytometry. *Rev. Méd. Chile.* 1999;127: 1-19.
 14. Chihuailaf RH. Contreras P, Wittwe F. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación de la salud animal. *Vet. México.* 2002;3:33
 15. Cisneros BE. La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. Editorial Limusa. México, DF. 2005: 34-41
 16. Comisión Nacional del Agua del Estado de México (2008)
 17. Devlin, E.W. Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos. *Ecotoxicol.* 2006; 15(1): 97-110.
 18. Duffus JH. *Toxicología ambiental.* Omega. España. 2003:173.
 19. Feng-Quin Zhang, You-Shao Wang, Zhi-Ping Lou, Jun-De Dong. Effect of heavy metal stress on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Candelia Kandel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Elsevier* 2007;67:44-50
 20. Galar-Martínez M, Gómez-Oliván LM, Amaya Chávez A, Razo-Estrada C, Garcia-Medina S. Oxidative stress induced on *Cyprinus carpio* by contaminants present in the water and sediment of madín reservoir. *Journal of Environmental Science and Health A. Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering.* 2010;45(2):155-160.
 21. Guecheva T., Henriques J. A. P., Erdtmann B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat. Res.* 2001; 497:17-27.
 22. Harris WR, Breton G., Day JP. Speciation of aluminium in biological system. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1996;48: 543-568
 23. Hirt, Lourdes M. y Domitrovic, Hugo A. Toxicidad y Respuesta Histopatológica en *Aequidens portalegrensis* (Pisces, Cichlidae) Expuestos a Biclouro de Mercurio en Ensayos de Toxicidad Aguda y Subletales. 2004.

24. Koehn, J.D. Carpa (*Cyprinus carpio*) como invasor de gran alcance en canales australianos. *Biología de agua dulce*, 2004;49:882-894
25. Koyu A., Ozguner F., Caliskan S. y Karaca H. Preventive effect of vitamin E on iron-induced oxidative damage in rabbit. *Toxicol. and Health*. 2005; 21(9):239-42.
26. Kumar V., Abbas A. K., Fausto N. *Robbins and Cotran Patología Humana*. Elsevier. Madrid, España. 2005: 293-296.
27. Lauwerys RR, Bernard AM, Buchet JP, Roels HA. Mercury: exposure markers as predictors of nephrotoxic effects. *Clin. Chem*. 1994;40: 1391-1394
28. Lozada-Zarate E. J., Monkx S., Pulido-Flores G., Gordillo-Martínez A. J., Prieto García F. Determinación de metales pesados en *Cyprinus carpio* en la laguna de Metztlán, Hidalgo, México. 2003:1-7
29. Martínez-Tabche L., Gómez-Oliván L., Galar M. M., López L. E. Estrés producido por sedimentos contaminados con níquel en una granja de trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces: Salmonidae). *Rev. Biol. Trop*. 2002; 50: 1159-1168.
30. Migliore L., Frenzilli G., Nesti C., Fortaner S., Sabbioni E. Cytogenetic and oxidative damage induced in human lymphocytes by platinum, rhodium and palladium compounds. *Mutagenesis*. 2002;17: 411-417.
31. Montero SA. Evaluación del efecto tóxico del hierro en sedimentos artificiales sobre *Moina macrocopa* (Tesis) México DF. Universidad Autónoma del Estado de México
32. Neson S McCordJ. Hierro radicales libres y enfermedades. *Adr. Mol. Cell. Biol*. 2002;25:157-183
33. NOM-002-SEMARNAT-1996. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal
34. Páez OF. Efecto de los metales. 1996:349-361
35. Sorely C. Bello, Minerva C. Rodríguez, Denny R. Fernández, Aracelis del C. Vásquez, Ana M. Ocando, José R. Contreras y Víctor A. Granadillo. Niveles de mercurio en cabello de individuos expuestos ocupacionalmente en el área odontológica. *SciELO*. 2002;40: (2)

36. Stohs S. J. y Bagchi D. Oxidative Mechanism in the Toxicity of Metal Ions. Free Radicals Biol. Med. 1995; 18:321-336.
37. Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M., Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2)2006, 178-189.
38. Van der Oost R., Beyer J. Vermeulen N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2003;13:57-149.
39. Ward RJ, McCrohan CR White KN. Influence of aqueous aluminium on the immune system of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Aquatic toxicology* 2006
40. Yokel RA. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology*. 2000; 5:813-28
41. Yousef MI, El-Morsy AM, Hassan MS. Aluminium induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 2005; 215(1-2):97-107