



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA

EVALUACION DEL EFECTO DEL PARACETAMOL
EN GENES DE DETOXIFICACION DE *DAPHNIA*
MAGNA

POR
RENÉ IGNACIO OLIVARES ESCALA

Trabajo de fin de carrera presentado en la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Químico
Farmacéutico

Profesional Guía: Roberto Urrutia Pérez
Laboratorio de bioensayos. Facultad de ciencias ambientales

Profesor patrocinante: Claudio Aguayo Tapia
Departamento de Bioquímica e Inmunología, Facultad de Química y Farmacia

junio, 2020
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al profesor guía de esta tesis de pregrado, Dr. Roberto Urrutia, por el apoyo que ha brindado a este trabajo, por la confianza que ha tenido en mi para realizar esta investigación y la facilidad que me ha dado para poder desarrollarla. Gracias por todo el apoyo que me dio desde que llegué a esta facultad.

Así mismo agradezco a mi profesor patrocinante, Dr. Claudio Aguayo, también por el apoyo y conocimiento brindado durante todo este trabajo. El conocimiento brindado, su orientación y atención a mis consultas sobre metodología, material facilitado y la revisión que ha dado a este texto.

Este trabajo de investigación no habría sido posible de realizar sin el apoyo incondicional del equipo de laboratorio de Bioensayos, gracias por recibirme hace ya 3 años, por sus conocimientos, sus valiosas sugerencias en momentos de duda, el apoyo moral, los buenos momentos y la amistad forjada, mis más sinceros agradecimientos.

Gracias a mi familia por el gran apoyo moral y comprensión durante todo el período universitario y más durante este último tiempo.

A todos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPOTESIS:	14
3. OBJETIVOS:	14
3.1. Objetivo general:.....	14
3.2. Objetivos específicos:	15
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA	16
4.1. Bioensayos con <i>Daphnia magna</i>	16
4.1.2. Obtención de concentración de concentración letal y subletal	17
4.2.1. Extracción de ADN mitocondrial para identificación molecular.	18
4.2.2. Extracción de ARNm y transcripción reversa.....	19
4.2.3. PCR para identificación molecular.	20
4.2.4. RT-qPCR de genes HR-96, CYP 314 y GST.....	21
4.3. Análisis estadístico.	23
4.4. Análisis de expresión genética.....	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Identificación molecular de <i>Daphnia magna</i>	24
5.2. Determinación de concentración letal y subletal.	27
5.3. Modificación en expresión genética por paracetamol.....	28
5.3.1. Amplificación genes de referencia GAPDH y Actina.....	28
5.3.2. Efecto del paracetamol en la expresión de HR96 mRNA.	31
5.3.3. Efecto del paracetamol en la expresión de GST mRNA.	34
5.3.4. Efecto del paracetamol en la expresión de CYP314 mRNA.	37
6. DISCUSIÓN	39

6.1. Identificación molecular de <i>Daphnia magna</i>	39
6.2. Concentración letal y subletal de paracetamol.....	40
6.3. Efecto del paracetamol en expresión genética.....	41
7. CONCLUSIONES:	46
8. Referencias:	49

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1-1: Propiedades fisicoquímicas del paracetamol.....	6
Tabla 4-1: Partidores utilizados en PCR para identificación molecula	21
Tabla 4-2: Partidores utilizados en PCR en tiempo real de cada gen.	22
Tabla 5-1: Secuencias de los genes 12 S y 16S	26
Tabla 5-2: Comparación de secuencias parciales del gen 12S	26
Tabla 5-3: Comparación de secuencias del gen 16S	27

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1-1: Ciclo de contaminación del agua	2
Figura 5-1: Electroforesis genes 12S y 16S.....	25
Figura 5-2: Concentraciones letales (LC) por paracetamol luego de 48 horas .	28
Figura 5-3: Perfil de amplificación del gen GAPDH.....	29
Figura 5-4: Perfil de amplificación del gen de referencia Act.....	30
Figura 5-5: Amplificación gen HR-96	33
Figura 5-6: Modificación genética del gen HR-96 en los grupos 1, 2 y 3.....	33
Figura 5-7: Perfil de amplificación del gen GST	35
Figura 5-8: Modificación genética del gen GST en los grupos 1, 2 y 3.....	36
Figura 5-9: Amplificación del gen CYP 314 en gradiente de temperatura	38

RESUMEN.

En este trabajo se expuso a organismos correspondientes de la especie *Daphnia magna* a paracetamol por 21 días durante 3 generaciones distintas, para determinar el efecto del paracetamol en la modificación en la expresión genética de los genes detoxificadores Hormone-Like receptor-96 (HR-96), Glutación-S-transferasa (GST) y Citocromo P 314 (CYP314) mediante la técnica de RT-qPCR. Para esto, el organismo fue identificado mediante técnicas moleculares, obteniendo en un 100% la identidad de *Daphnia magna*. Las generaciones utilizadas corresponden a: Los organismos iniciales, la reproducción del día 10 y la reproducción del día 21, a las cuales se les nombró como grupo 1, 2 y 3 respectivamente.

Los resultados obtenidos de la modificación en la expresión genética muestran una inhibición significativa para los genes HR-96 (G1: 32.58%, G2: 27.08%) y GST (G1: 33.22%, G2: 20.16%) para luego aumentar su expresión genética respecto al basal, de forma no significativa en HR-96 (G3: 9.68%) y significativa en GST (G3 9.68%). Además, se determinaron concentraciones letales y subletales del paracetamol a través de bioensayos agudos de 48 horas, obteniendo resultados de LC50 de 14.795 mg/L y LC10 de 1.120 mg/L.

ABSTRACT

In this work, 30 organisms of *Daphnia magna* specie were exposed to paracetamol for 21 days for 3 generations, to determine the effect of paracetamol in the genetic expression of 3 different gene targets: Hormone Like Receptor-96 (HR-96), Glutathione-S-transferase (GST) and Cytochrome P 314 (CYP314) using the RT-qPCR technique. For this, the organism was identified by molecular techniques, obtaining 100% identity of *Daphnia magna*. The generations used correspond to: The initial organisms, the reproduction on day 10 and the reproduction on day 21, which were named as groups 1, 2 and 3 respectively.

The results obtained from the modification in gene expression identified a significant inhibition for the genes HR-96 (G1: 32.58%, G2: 27.08%) and GST (G1: 33.22%, G2: 20.16%) genes, to later increase their gene expression respect to their baseline, not significantly in HR-96 (G3: 9.68%) and significantly in GST (G3 9.68%). In addition, the lethal and sublethal concentrations of paracetamol were determined through acute 48-hour bioassays, obtaining results of LC50 of 14,795 mg/L and LC10 of 1,120 mg/L.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una gran problemática debido a la cantidad de sustancias tóxicas que están presentes en el ambiente. Estas sustancias derivan de los procesos industriales, de la actividad humana y de los actuales sistemas agrarios cada vez más intensos, las cuales van afectando dañinamente el ecosistema(Plaa et al., 1982; Sanchez-Bayo et al., 2012).



En los últimos años se han encontrado nuevas sustancias tóxicas en el ambiente, los que han sido asignados como contaminantes emergentes. Estos son sustancias previamente desconocidas como contaminante o no reconocidas como tal, cuya presencia en el medio puede provocar consecuencias desconocidas(Rosenfeld & Feng et al., 2011). Entre los contaminantes emergentes encontrados en el medio acuático cabe destacar fármacos, pesticidas, hormonas y productos de higiene y cuidado personal(Langdon et al., 2011).

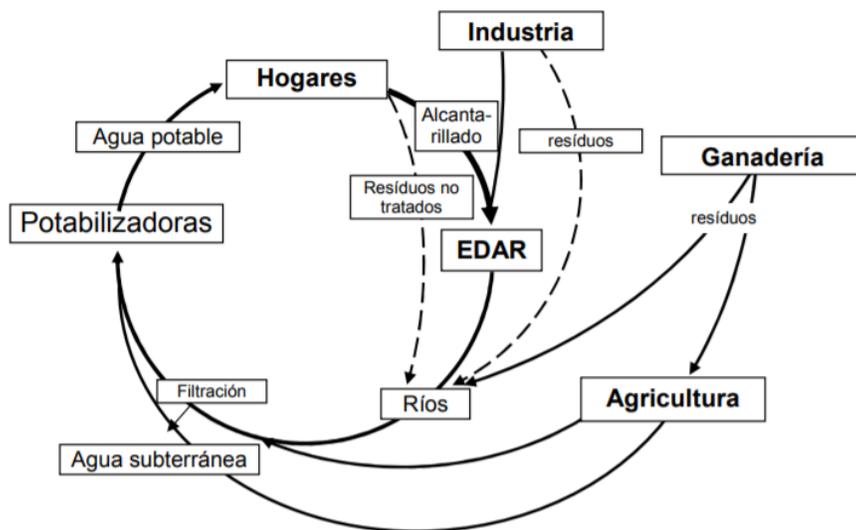


Figura 1-1: Ciclo de contaminación del agua (Barceló, 2014).

Mundialmente el uso de medicamentos ha aumentado progresivamente durante las últimas décadas y actualmente se ha detectado la presencia de varios fármacos en el ambiente, especialmente en ecosistemas acuáticos (Fent et al., 2006; Petrović et al., 2003; Veiga-Gómez et al., 2017). En general se han encontrado numerosas familias de medicamentos; antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), β -bloqueadores, antidepresivos, tranquilizantes y, los más prevalentes, analgésicos y antipiréticos (Nikolaou et al., 2007).

Más de 200 fármacos se han reportado en ríos a nivel mundial, con concentraciones entre ng/L hasta $\mu\text{g/L}$ en aguas superficiales (Buser et al., 1999). Antibióticos se han encontrado en altas concentraciones, llegando a niveles de

6,5 mg/L para ciprofloxacino(Chen & Zhou, 2014; Hughes et al., 2013), causando aumentos en la resistencia bacteriana, esto representa un gran problema para la salud mundial en este siglo.

Estudios realizados en Inglaterra detectaron 70 compuestos diferentes, 60 de ellos son compuestos farmacéuticos, por ejemplo tramadol, que fue detectado con concentraciones de 6 µg/L, ibuprofeno y paracetamol, en concentraciones de 2,2 µg/L y 1,3 µg/L respectivamente(Petrie et al., 2015). Dentro de la Unión Europea se han realizado diversos estudios, uno de ellos analizó 33 compuestos en aguas superficiales, ellos identificaron productos de limpieza y mayoritariamente fármacos(Ebele et al., 2017), como 17β-estradiol (E2), 17α-etinilestradiol (EE2) y diclofenaco como sustancias peligrosas(Sanchez et al., 2011).

Chile no se encuentra ajeno a esto, el consumo de medicamentos ha aumentado progresivamente en la población, así la Encuesta nacional de salud, 2009-2010, muestra que los analgésicos son los más consumidos con un 22.7%, entre ellos aspirina y paracetamol(Minsal, 2013). El hecho de la presencia de medicamentos en el ambiente se debe a la mala eliminación de ellos y a su fácil llegada a los cuerpos de agua. Estos son eliminados a través del desagüe de las casas o bien

arrastrados por la precipitación y lixiviados de los rellenos sanitarios(Gracia-Lor et al., 2012).

En nuestro país las normativas vigentes no consideran a los fármacos como contaminante, por lo que no existe un control en su eliminación, actualmente solo existen procedimientos de eliminación para industrias y centros asistenciales, por ejemplo:

- Nch 409/1. Of2005 Agua potable: Esta norma establece los requisitos de calidad que debe cumplir el agua potable en el territorio nacional. Dentro de del parámetro tipo II, criterios para elementos o sustancias químicas de importancia para la salud, no se consideran los fármacos como un elemento de importancia(NCh409, 2005).
- Ley 19300 Ley sobre bases generales del medio ambiente: En la enumeración de proyectos o actividades susceptibles a causar impacto ambiental, en cualquiera de sus fases, no fueron considerados los procesos en industria farmacéutica, como tampoco la eliminación de medicamentos(Ministerio de ambiente, 1994).
- D.S 90/00 Norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales: Establece en una lista los contaminantes con

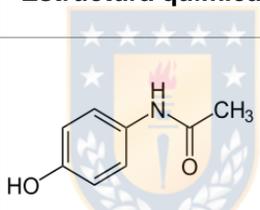
sus valores máximos y carga diaria, entre los cuales no figuran medicamentos(D.S 90/00, 2001).

- Circular N°B35/38 Ministerio de Salud, Instrucciones para el adecuado proceso de eliminación de residuos de medicamentos en mal estado y vencidos generados en establecimientos de salud: Circular que describe y agrupa medicamentos según el daño que pueden provocar, e indica que los medicamentos deben ser eliminados por el alcantarillado, ya que las concentraciones detectadas en fuentes de agua potable no revisten riesgos para la salud de la población(*Minsal., 2012*).
- NCh 1333 Of78 Requisitos de calidad de agua para diferentes usos: Norma que describe los requisitos mínimos de calidad para distintos usos. Dentro de la tabla de contaminantes no se encuentra ningún medicamento(*NCh1333., 1978*).

Dentro de los medicamentos, el paracetamol es ampliamente usado debido a su alta efectividad como analgésico y antipirético, actuando como antagonista de la ciclooxigenasa 3 (COX-3), mecanismo similar al de los AINEs, que después es metabolizado y eliminado por la orina. Su gran efectividad y bajo costo ha hecho que sea usado en forma abusiva como analgésico de prioridad por la población

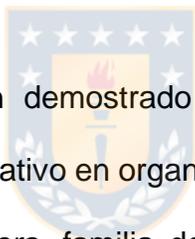
chilena, lo que ha ocasionado un aumento en el número de intoxicaciones y hepatotoxicidad por el mal uso de este medicamento. Las propiedades fisicoquímicas de este fármaco(PubChem, s. f.), indicadas en la Tabla N°1, le permiten disolverse y distribuirse sin problemas en fuentes de agua, pudiendo afectar de esta forma en el ecosistema acuático.

Tabla 1-1: Propiedades fisicoquímicas del paracetamol.

Compuesto	Tipo	Estructura química	N° cas	Solubilidad en agua	Log k_{ow}	T $_{1/2}$ en agua (horas)
Paracetamol $C_8H_9NO_2$ PM=151,17 g/mol	Analgésico		103-90-2	$1,4 \times 10^4$	0.46	360h (15 días)

Debido a las propiedades de estos compuestos, no es posible eliminarlos fácilmente en las plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS) de Chile a través de los tratamientos convencionales, donde el tratamiento predominante es el de Lodos Activados, con un 59% entre todas las PTAS del país(*Sistemas de Tratamiento de Aguas Servidas*, s. f.). Algunos estudios han demostrado que la adición de tratamientos con irradiación UV y H_2O_2 ” permite una mayor eliminación de fármacos presentes en el agua, entre un 45% a un 86%(Köhler et al., 2012; Zupanc et al., 2013).

A causa de esto, se ha investigado la prevalencia de medicamentos en agua potable, donde un análisis el año 2017 en el río Biobío y en la planta de tratamiento de agua “La Mochita”, se obtuvieron resultados positivos para sucralosa, cafeína, trimetoprim y paracetamol (Ramírez et al., 2017). Al momento de este análisis se encontraron concentraciones de paracetamol de 0.360 µg/L y 0.590 µg/L en el río Biobío; y 0.040 µg/L en la planta de tratamiento, las cuales se describieron sin efecto en la salud del ecosistema debido a no demostrar tener una acción en su capacidad regenerativa.



Previas investigaciones han demostrado que este analgésico tiene efectos neurotóxicos y de estrés oxidativo en organismos acuáticos, especialmente en el suborden *Cladocera* y *Rotifera*, familia de organismos de gran sensibilidad a cambios en el ambiente acuático (Oliveira et al., 2015). Otros trabajos sugieren que el paracetamol inhibe significativamente las enzimas acetilcolinesterasa, glutatión-s-transferasa dependiente de selenio y catalasa, lo que se traduce en toxicidad neurológica e inactivación enzimática (Daniel et al., 2019). Sin embargo, no existen estudios a nivel genético que determinen el efecto de este medicamento en el ecosistema acuático.

Para determinar qué efecto tiene un contaminante en el ecosistema acuático, como será el paracetamol en este caso, se deben realizar una serie de estudios

de toxicidad en los cuales se deben usar organismos que cumplan con características específicas, como ser altamente sensibles a cualquier cambio en su ecosistema, poseer estabilidad genética, tener un ciclo de vida corto y una alta tasa de reproducción, estar distribuido ampliamente a nivel geográfico y que sea de fácil manipulación. Estos organismos son llamados bioindicadores, entre los cuales se utilizan microalgas, *Diplodon chilensis*, *Onchorhynchus Mykiss* y *Daphnia magna*.

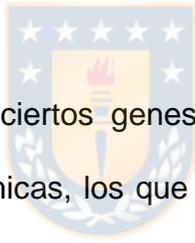
Con los organismos anteriormente nombrados se realizan bioensayos de toxicidad realizados bajo condiciones de laboratorio, lo que permite determinar de forma cuantificable el efecto de compuestos químicos en el ecosistema. Se pueden realizar dos tipos de bioensayos de toxicidad(Utrillas et al., 2004):

- De Toxicidad Aguda: Donde se observan los efectos que se producen a corto plazo por la exposición del organismo a una determinada concentración del químico. Ya sea a las 24 horas o 48 horas. De aquí se pueden obtener distintos tipos de resultados como:
 - Concentración Letal 50 (LC₅₀): Concentración de la sustancia tóxica que produce la muerte del 50% de la población expuesta, después de un determinado periodo de exposición.

- Concentración Letal 10 (LC₁₀): Concentración de la sustancia tóxica que produce la muerte del 10% de la población expuesta, después de un determinado periodo de exposición.
 - Concentración Efectiva 50 (EC₅₀): Concentración de una sustancia en la que se observa un efecto agudo en el 50% de la población expuesta, después de un determinado periodo de exposición.
 - Concentración de Inhibición (IC₅₀): Concentración estimada que podría causar la reducción de parámetros biológicos, como fecundidad, crecimiento, etc de la población expuesta.
- De toxicidad crónica: Donde se observan los efectos de la exposición del organismo por 21 días. Tienen como objetivo estimar la mayor concentración no efectiva o segura de los agentes tóxicos ensayados y establecer límites de tolerancia para la presencia de estos contaminantes.

En estos estudios se utiliza mayoritariamente el organismo *Daphnia magna*, un crustáceo planctónico de agua dulce, de la familia *Cladocera*, que se emplea como bioindicador en ecosistemas acuáticos gracias a su alta sensibilidad a una

amplia gama de productos químicos, ciclo de vida corto, alta reproducción a través de partenogénesis, por lo que posee alta estabilidad genética y fácil manipulación en el laboratorio(Ebert et al., 2005). Además, está distribuido en varias fuentes de agua dulce a nivel mundial, encontrándose alrededor de todo el planeta. Estos crustáceos desempeñan un papel clave en la transferencia de energía y nutrientes a las redes alimentarias superiores, por lo que también es una importante especie como centinela ecológico(Barata et al., 2001).



Se ha observado que hay ciertos genes metabólicos que se modifican con facilidad por sustancias químicas, los que posteriormente son heredados a sus generaciones, produciendo así una alteración a largo plazo del ecosistema.

Para determinar si un compuesto, o fármaco en este caso, puede generar o no un impacto sobre la expresión genética de estos genes anteriormente descritos, es necesario realizar una técnica que permita medir cuanto se expresan los genes. Para lograr cuantificar la expresión de un gen es necesario recurrir a la técnica de qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), también llamada PCR en tiempo real o PCR cuantitativa.). La PCR en tiempo real se basa en el principio de la PCR desarrollado por Kary Mullis, que permite detectar ADN a partir de pequeñas cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de

veces(Mullis, 1990), lo que hace que sea la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN)(Wong et al., 2005).

La PCR en tiempo real permite cuantificar expresión génica a través de una cuantificación relativa, midiendo los cambios en el estado basal del gen de interés versus un gen que tenga una expresión constante, llamados también controles endógenos o genes “Housekeeping”, los que actuarán como control. Esto permite observar diferencias entre el control endógeno, que no cambiará por ningún estímulo y el gen que estamos estudiando(Aguilera et al., 2014).



El paracetamol fue elegido como el medicamento a estudiar, al ser uno de los medicamentos más consumidos por la población chilena según la “Encuesta Nacional en Salud” anteriormente nombrada, la “Revisión de la Evidencia del Mercado Nacional de Farmacos”(Cenafar, 2013), y también en el último registro entregado por el Instituto de Salud Pública (ISP), el año 2016, el que presentó los resultados de los 20 medicamentos más vendidos en el país, siendo el paracetamol el número uno, con una cantidad de 3.97 millones de unidades vendidas(ISP, 2016).

En cuanto a los genes, aquellos relacionados a la metabolización y detoxificación del paracetamol son:

1. Glutathion-S-transferasa (GST) es una de las principales enzimas encargadas de la detoxificación de radicales oxidativos en los organismos. Se ha reportado que para *Daphnia spp*, la catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) son las enzimas encargadas de proteger las células de radicales oxidativos por distintos factores, ya sean endógenos como exógenos. La activación de estas enzimas varía dependiendo de oxígeno y exposición a UV(Borgeraas et al., 2002; Rozas et al., 2016). La GST interactúa conjugando el metabolito secundario prooxidante del paracetamol como es el NAPQI.
2. Citocromo P 314 (CYP314) es la enzima principal de este organismo para sintetizar ecdisona, hormona esteroideal principal en el proceso de muda de caparazón. La ecdisoma junto a su receptor son capaces de regular genes involucrados en el desarrollo y reproducción de invertebrados(Rewitz & Gilbert et al., 2008). La familia de citocromos actúa metabolizando el paracetamol para que este sea eliminado del organismo.
3. Hormone-Like receptor 96 (HR96) es un receptor que juega un rol principal en la detoxificación de xenobióticos y protección contra diversas sustancias

químicas. Se ha observado que este receptor se activa por una gran cantidad de principios activos(Karimullina et al., 2012). La modificación en la expresión de este gen se observa en alteraciones alimenticias, aumentando la resistencia a la desnutrición y alteración en los niveles de triglicéridos(Karimullina et al., 2012; Sengupta et al., 2016).

Para determinar la posible acción modificadora del paracetamol en la expresión genética de este organismo, se analizará la expresión de estos genes a través de la técnica de RT-qPCR, técnica que permite transcribir el ARN mensajero en ADNc o ADN complementario y así obtener cuanto se está sintetizando para estos genes.



2. HIPOTESIS

Producto de la actividad del paracetamol, se hipotiza que la exposición crónica de *Daphnia magna* a este fármaco producirá un cambio en la expresión de genes que codifican las enzimas HR-96, CYP314 y GST, responsables de los mecanismos de detoxificación celular.



3. OBJETIVOS:

3.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto de la exposición crónica del paracetamol en genes de detoxificación en *Daphnia magna*.

3.2. Objetivos específicos:

- Identificar de forma molecular la especie de prueba *Daphnia magna*.
- Determinar las concentraciones letales y subletales para *D. magna* del paracetamol.
- Determinar el efecto del paracetamol sobre la expresión genética de
 - Hormone-Like receptor 96 (HR96)
 - Citocromo P 314 (CYP314)
 - Glutación S-transferasa (GST)
- Cuantificar la diferencia de expresión entre los genes de metabolismo expuestos a paracetamol y los de control.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. Bioensayos con *Daphnia magna*.

4.1.1. Mantención de cultivos

60 neonatos de *Daphnia magna* (menores de 24 horas de edad) se tomaron por ensayo, dividiendo una mitad como población de control y la otra mitad como población expuesta a 1 mg/L de paracetamol. Cada población se colocó por separado en un litro de medio de cultivo, compuesto por sales inorgánicas de CaCO₃, KCl, NaHCO₃ y MgSO₄ disueltas en agua desionizada, el que fue cambiado 3 veces por semana. Al medio de cultivo se le midió pH, el que estuvo entre 7.8 y 8.0, la conductividad no superó los 10 µS/cm y el oxígeno disuelto saturado fue sobre el 85% a 20°C. Estas fueron alimentadas con 0.5 ml/L de suspensión proteica Trout Chow cerophyl-yast y 0.5 ml/L de microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Chlorella vulgaris* 3 veces por semana. Durante todo su ciclo vivieron en cámaras de fotoperíodo, donde tuvieron ciclos de luz y oscuridad dentro de 24 horas y mantuvieron una temperatura de 20°C (NCh02083, 1999). El día 10 se tomaron los neonatos para realizar nuevos

cultivos de control y de exposición a 1 mg/L de paracetamol, mientras que el día 21 se realiza el mismo procedimiento a la misma concentración, pudiendo observar así el efecto de la cronicidad del paracetamol en los genes de metabolismo a estudiar. Luego de 21 días de desarrollo, las *Daphnias* fueron sacrificadas y procesadas para extraer ARN y ser amplificado mediante la técnica de PCR en tiempo real. Además, cada bioensayo contó con 3 réplicas para cada generación (día 1, 10 y 21), obteniendo así un n=3.



4.1.2. Obtención de concentración de concentración letal y subletal

Basado en experimentos preliminares (Du et al., 2016; Iannacone & Alvarino et al., 2009) y en concentraciones ambientales reportadas, se seleccionaron 5 concentraciones de forma ascendente (1, 60, 120, 180 y 240 mg/L) para obtener las concentraciones letales y subletales, como LC50 y LC10, a través de un bioensayo de toxicidad agudo. Este bioensayo consistió en la exposición de 20 neonatos de *D. magna* por concentración, distribuidos en 5 neonatos por recipiente, en un volumen total de 10 mL. Los neonatos tuvieron menos de 24 horas al momento de iniciar el bioensayo y fueron expuestos por 48 horas sin alimentación o cambio de medio. Pasado este período se procedió a realizar el recuento de muertes de los organismos.

Para obtener los valores de concentración letal, se analizaron los resultados por el método estadístico Spearman-Karber a través del programa de análisis EPA Probit versión 1.5. Para calcular homogeneidad de datos se realizó Chi cuadrado. Los valores de LC10 a LC90 se informaron como media, con intervalos de confianza del 95%.

4.2. Modificación genética por paracetamol en *D. magna*.



4.2.1. Extracción de ADN mitocondrial para identificación molecular.

30 Daphnias en estado adulto fueron reunidas en grupos de 10 en tubos de homogeneización para ser procesadas con el kit de extracción de ADN en columna “QIAamp Fast DNA Tissue Kit” donde se siguió el protocolo de extracción del respectivo kit y homogeneizadas por un homogeneizador 3D “Precellys”. El ADN fue extraído y congelado a -80°C para posterior uso.

4.2.2. Extracción de ARNm y transcripción reversa.

Cada bioensayo fue separado en grupos de 10 *Daphnias* adultas, de 21 días, en tubos de homogeneización y agregado 1 ml de Trizol, posteriormente fueron homogeneizadas en el homogeneizador 3D “Precellys” y se extrajo el ARN siguiendo el protocolo de extracción por Trizol en columna en un nuevo tubo eppendorf. En este tubo se agregaron 200 μ L de cloroformo y se centrifugó a máxima potencia por 15 min. a 4°C. Se trasladó la fase superior que contiene ARN a un nuevo eppendorf donde se agregó 500 μ L de isopropanol, se incubó por 10 min. y se volvió a centrifugar a max. potencia por 15 min. a 4°C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 500 μ L de etanol al 75%, se centrifugó a max. potencia por 5 min. a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por 10 minutos. Los sedimentos fueron resuspendidos en 20 μ L de agua libre de nucleasas.

El ARNm extraído fue transformado a ADN complementario (cDNA) a través del proceso de transcripción reversa gracias al kit “Omniscript® Reverse Transcription”. En este proceso se realizó primero un mix con el 10x Buffer RT, mix de dNTP, random primers 10 μ M, la transcriptasa reversa Omniscript y el ARN templado. Se mezcló por vórtex y centrifugó brevemente. Posteriormente se dejó incubar la mezcla a 37°C por 60 minutos. El cDNA fue cuantificado por el

fluorómetro DeNovix “DS-11 FX +”, serie S-03577 con absorbancia entre 260 y 280 nm.

4.2.3. PCR para identificación molecular.

Del ADN mitocondrial se amplificaron las subunidades rRNA 12S y16S en el termociclador “Step-One” de Termofisher, serie 2710004779. Se utilizó la enzima polimerasa “MyTaq Red DNA Polymerase” junto a sus nucleótidos y partidores indicados en la tabla 4-1, obtenidos por bibliografía, como también diseñados por “Primer3”. Las condiciones de reacción para el gen 12S fueron: Denaturalización inicial por 5 min. a 94°C, 35 ciclos de denaturalización por 30 seg. a 94°C, annealing por 30 seg. a 56°C y extensión por 1 min. 45 seg, seguido de una extensión final por 10 min. a 72°C(Zuykova et al., 2013). Las condiciones para el gen 16S fueron: Denaturalización inicial por 2 min. a 94°C, 35 ciclos de denaturalización por 30 seg. a 94°C, annealing por 30 seg. a 56°C y extensión por 1 min. 45 seg. a 72°C, seguido de una extensión final por 2 min. a 72°C. Posteriormente los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 60 volts por 180 minutos con bromuro de etidio como intercalante. El ADN fue purificado a través del kit “Genejet gel extraction” para luego ser enviado a secuenciar a la “Pontífice Universidad Católica” en Santiago.

4.2.4. RT-qPCR de genes HR-96, CYP 314 y GST.

Se realizó la técnica de cuantificación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para analizar la respuesta de la expresión genética de *D. magna* expuesta a paracetamol. Los primers utilizados en la qPCR fueron diseñados de acuerdo a secuencias ya existentes, descritos en la tabla 4-1, donde el GAPDH y Act(Heckmann et al., 2006) fueron usados como estándar interno, mientras que los otros 3 genes fueron usados para analizar la respuesta de la expresión genética en *D. magna* post exposición al paracetamol. Como muestra la tabla 4-2 se utilizaron primers ya descritos en publicaciones anteriores donde demostraron tener un buen funcionamiento y además se realizó una curva estándar para determinar la eficiencia de ellos.

Tabla 4-1: Partidores utilizados en PCR para identificación molecular de *Daphnia magna*.

Genes	Forward primer	Reverse primer	Tamaño amplicon (pb)	Origen
12 S (bibliografía)	ATGCACTTTCCAGTAC ATCTAC	AAATCGTGCCAGCC GTCGC	602	GenBank: JN903683
12 S (Primer3)	ACTGCACCTTGACCT GAAGT	AAAGGTTTTGGCGGC ATTCT	501	GenBank: U34738
16 S (bibliografía)	TTTGTAATAGCCG CAGT	GGGTCTGATCGTCC TTCAAA	169	GenBank: AY921452
16 S (Primer3)	GTACCGTCTGCTCAA TGCAA	GGGTCTGATCGTCCT TCAAA	189	GenBank: AY921452

La expresión de los genes a trabajar fue cuantificada por el termociclador “Step-One” de Termofisher, serie 2710004779. El kit para su amplificación y detección fue “Brilliant II Sybr green qPCR master mix”. Cada mix contuvo un volumen de reacción de 25 μ L, el cual contenía 12,5 μ L Sybr green mix taq (x5), 1 μ L de cada primer, 2 μ L de cDNA, 0,375 μ L fluoróforo ROX y fue completado hasta 25 μ L con H₂O libre de RNAsas. La concentración de cDNA con la que se trabajó fue de 100 ng/ μ L. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 15 min. a 95°C y 40 ciclos de 30 seg. a 95°C, 1 min. a 50°C y 30 seg. a 72°C (Liu et al., 2017). Al final de cada reacción se realizó un análisis de curva de melting para determinar la formación de productos específicos y presencia dímeros. Cada reacción fue realizada en triplicado para confirmar reproducibilidad de los resultados.

Tabla 4-2: Partidores utilizados en PCR en tiempo real de cada gen.

Genes	Forward primer	Reverse primer	Tamaño amplicon (pb)	Origen
HR96 (Bibliografía)	GTCTGGGAAAGTTTG TGGAGTAT	GAACCTGCGTGAACAGC ATCTA	172	GenBank: JQ026113.1
CYP314 (Bibliografía)	ACTATGTATGGACTTCCC TGGTG	TTATCGCGGGTGT CAACG	194	GenBank: AB257771.1
GST (Primer3)	GGGAGTCTTTTACCACCG TTTC	TCGCCAGCAGCATACT TGTT	155	GenBank: KF736983.1
GAPDH (Primer3)	GGCAAGCTAGTTGTCA ATGG	TATTCAGCTCCAGCAG TTCC	89	AJ292555
Actina (Primer3)	GAGACCGTCTACAAC CGAT	GTGTGCAGAGACAA TGAG	491	AJ292554

4.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico para los resultados del QPCR fue realizado por el software GraphPad Prism 8.0.1. Se utilizó el análisis test t en cada columna para evaluar la significancia o diferencia entre los grupos expuestos y el control. Los resultados experimentales fueron informados como media \pm desviación estándar.

4.4. Análisis de expresión genética.



Los resultados fueron analizados mediante el método $\Delta\Delta CT$ donde se compararon los genes target HR96, GST y Citocromo 314 con el gen de referencia utilizado GAPDH.

Se realizó una curva estándar de dilución para validar los resultados y comprar la eficiencia de los partidores utilizados en cada gen. La curva constó de 5 puntos, los cuales fueron concentraciones decrecientes por un factor de dilución 1:3 comenzando por una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Cada punto fue realizado en triplicado para mayor validez en los resultados. El umbral obtenido en esta curva fue utilizado para obtener los CT en los qPCR a realizar. La eficiencia obtenida de los partidores se mantuvo dentro de los rangos de 95-105

5. RESULTADOS

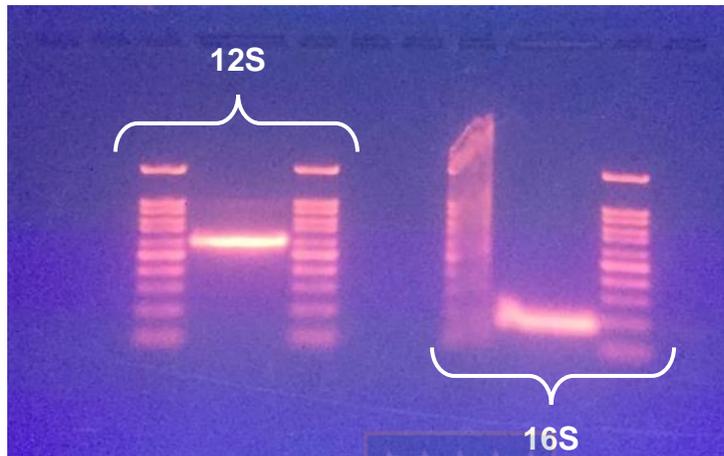
5.1. Identificación molecular de *Daphnia magna*.

En la figura 5-1 se puede observar la electroforesis de la amplificación de los genes de *D. magna* en un gel de agarosa, realizada con los partidores sintetizados en Primer3, obteniendo resultados para el gen 12S un tamaño de aproximadamente 600pb y para el gen 16S un tamaño aproximado de 200pb, los mismos resultados que los informados en bibliografía (Zuykova et al., 2013). Los fragmentos de ADN fueron secuenciados en el laboratorio de la PUC, donde se obtuvieron las secuencias presentadas en la tabla 5-1.

La amplificación del fragmento del gen 12S produjo una secuencia de 243 bp, la cual se comparó con secuencias del mismo gen para el organismo *Daphnia magna* a través del banco de genes NCBI. Al realizar el BLAST se obtuvo una similitud del 99.16% hasta 100% observable en la tabla 5-2. La amplificación del fragmento del gen 16S produjo una secuencia de 157 bp, que fue comparada con secuencias disponibles en el NCBI del mismo gen. Se le realizó

un BLAST a la secuencia, dando una similitud de hasta 99.34%, observable en la tabla 5-3.

A) Electroforesis genes 12S y 16S



B) Alineamiento Gen 12S:

Sequence ID: U34738.1 Length: 501

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
388 bits(210)	2e-107	228/237(96%)	0/237(0%)	Plus/Plus
Query 7	AAACATCCTTTTGGAGTAATCTGACAACGGAGGTATACAAGTTAAACAAATGAAGGTAAG	66		
Sbjct 195	AAACATCCTTTTGGAGTAATCTGACAACGGAGGTATACAAGCTAAACAAATGAAGGTAAG	254		
Query 67	ATAAACGAGGGTTATCGATTACAAGACAAGCTCCTCTGTTTGGTTAGAATGCCGCCAAA	126		
Sbjct 255	ATAAACGAGGGTTATCGATTATAAGACAAGCTCCTCTATTTGGTTAGAATGCCGCCAAA	314		
Query 127	ACCTTTGGGTTTGAAGAACAACCTTTACTACCTATTACCTATTGTAGAGAATAACAGGG	186		
Sbjct 315	ACCTTTGGGTTTGAAGAACGACTTTACTACCTATCACCTATTGTAGAGAATAACAGGG	374		
Query 187	TATCTAATCCTGGTTTTTGGTCTCTATTTTTATATCCCTTCAAATAAATAAGATA	243		
Sbjct 375	TATCTAATCCTGGTTTTTGGCCCTTTTTTATATCCCTTCAAATAAATAAGATA	431		

C) Alineamiento Gen 16S:

Sequence ID: AY921452.1 Length: 491

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
261 bits(141)	2e-69	148/151(98%)	1/151(0%)	Plus/Plus
Query 4	ATTCTGACTGTGCT-AGGTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTGGTATGAATG	62		
Sbjct 59	ATTCTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATGGGGCTGGTATGAATG	118		
Query 63	ACGAGACGAGAAAATGACTGTCTCTATAATAAACCTTGAATTTCAATTTCTGAGTAAAAA	122		
Sbjct 119	ACGAGACGAGAAAATGACTGTCTCTATAATAAACCTTGAATTTCAATTTCTGAGTAAAAA	178		
Query 123	GCTCAGATAATTTTGAAGGACGATCAGACCC	153		
Sbjct 179	GCTCAGATAATTTTGAAGGACGATCAGACCC	209		

Figura 5-1: A) Electroforesis de genes 12S y 16S de organismo *D. magna* realizada a 60V por 240 minutos con bromuro de etidio como intercalante. Primer

fragmento amplificado del gen 12S, secuencia U34738, con un tamaño de amplicon observable de ~600pb y tamaño informado de 501 pb. Segunda amplificación del gen 16S, secuencia AY921452, con un tamaño de amplicon observable de ~200pb y tamaño informado de 189pb. B) Alineamiento del gen 12S con la secuencia U34738, obteniendo una similitud de un 96% en esta secuencia parcial del gen. C) Alineamiento del gen 16S con la secuencia AY921452, utilizada para la síntesis de los partidores que se usaron en la identificación, obteniendo un porcentaje de similitud de 98% en esta secuencia parcial del gen.

Tabla 5-1: Secuencias de los genes 12 S y 16S, obtenidas luego de secuenciar en laboratorio de genética en la PUC.

Gen	Secuencia
12S-RNA (243 pb)	TTTTGAAACATCCTTTGGAGTAATCTGACAACGGAGGTATACAAGTTAAACAAATGA AGGTAAGATAAAACGAGGGTTATCGATTACAAGACAAGCTCCTCTGTTGGTTAGAAT GCCGCCAAAACCTTTGGGTTTGAAGAACAACCTTTACTACCCTATTACCTATTGTAGAG AATAACAGGGTATCTAATCCTGGTTTTGGTCTCTATTTTTATATTCCTCAAATAATTA AAGATA
16S-RNA (157 pb)	CGCATTCTGACTGTGCTAGGTAGCATAATCATTAGTCTTTTAATTGGAGGCTGGTATGAAT GACGAGACGAGAAAATGACTGTCTCTATAATAAATTTGAATTTTCATTTCTGAGTGAAAAAG CTCAGATAATTTTGAAGGACGATCAGACCCCAA

Tabla 2-2: Comparación de secuencias parciales del gen 12S obtenidas del banco de genes NCBI.

Descripción	N° pares de bases	Porcentaje identificación	GenBank
12S ribosomal RNA gene Europa	427 – 438	99.16% - 100.00%	JN903681 - JN903683
12S ribosomal RNA gene Israel	433	99.58%	DQ116603.1
12S ribosomal RNA gene USA	399	97.05%	AY921467.1

Tabla 5-3: Comparación de secuencias parciales del gen 16S obtenidas del banco de genes NCBI.

Descripción	N° pares de bases	Porcentaje identificación	GenBank
16S ribosomal RNA gene	272	99.34%	GQ343274 - GQ343302
16S ribosomal RNA gene	272	99.34%	KF993366
16S ribosomal RNA gene	272	99.34%	MF346501 - MF346511



5.2. Determinación de concentración letal y subletal.

Luego de 48 horas de exposición se hizo el recuento de muertes respectivo en cada concentración y se analizaron los resultados de mortalidad por el programa estadístico probit. Se obtuvo una concentración letal 50% (LC50) de 14.795 mg/L y una concentración letal 10% (LC10) de 1.120 mg/L descritos en la figura 2.

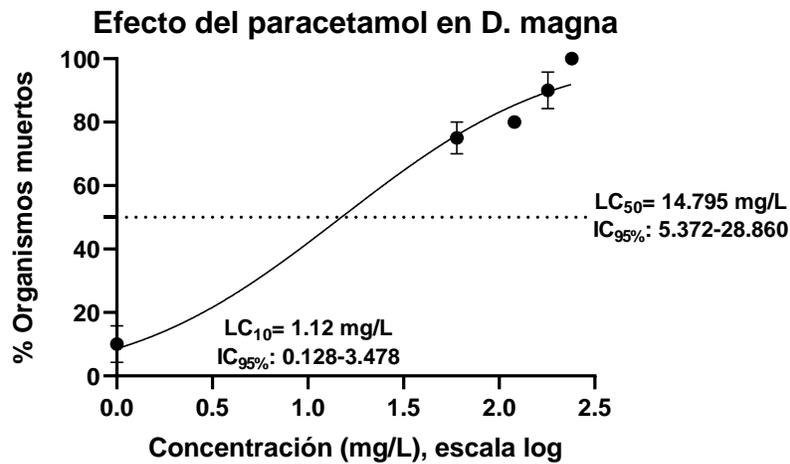


Figura 5-2: Concentraciones letales (LC) por paracetamol luego de 48 horas, n=5.

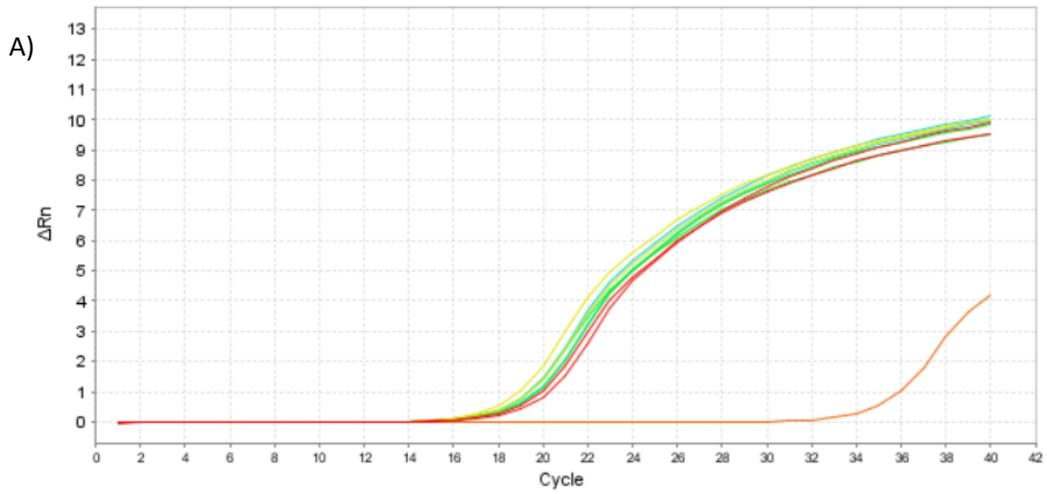


5.3. Modificación en expresión genética por paracetamol.

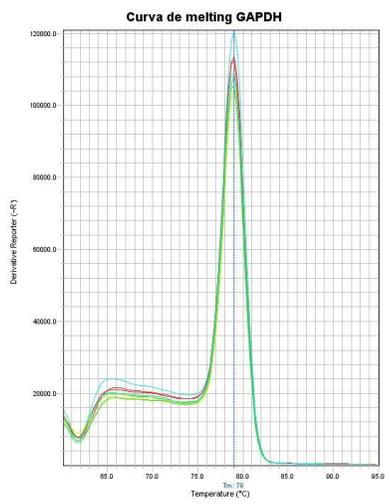
5.3.1. Amplificación genes de referencia GAPDH y Actina.

Como se puede observar en la figura 5-3, en A) la amplificación del gen GAPDH es constante y no se ve modificado por el efecto del paracetamol, por lo que es posible usarlo como gen de referencia para normalizar los datos. Se puede determinar una correcta amplificación sin producción de dímeros entre los partidores o productos secundarios ya que en la curva de melting en B) se puede observar un solo peak en todas las réplicas. Además, en C) se determinó la eficiencia de los partidores, obteniendo una eficiencia entre los rangos de 95 y 105%.

Amplificación GAPDH



B)



C)

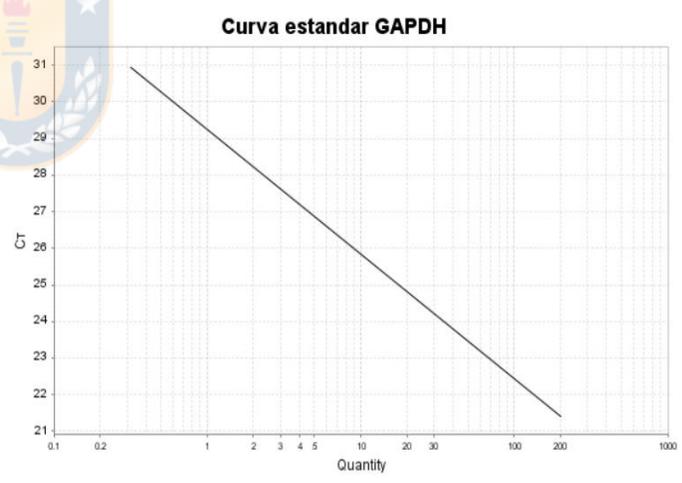


Figura 5-3: Perfil de amplificación del gen GAPDH. A) Perfil de amplificación, n=8. B) Curva de melting con un solo peak, sin presencia de dímeros ni productos secundarios. C) Curva estándar formada por 5 puntos en diluciones de 1:3, obteniendo una eficiencia de 97,06%.

La amplificación del gen Actina es observable en la figura 5-4, demostrando en A) que el perfil de amplificación de este gen se ve modificada por la acción del paracetamol, por lo que se determinó que no es útil como gen de referencia en este experimento. En B) se puede observar una curva de melting poco estable en la altura obtenida entre las réplicas, pero un solo peak.

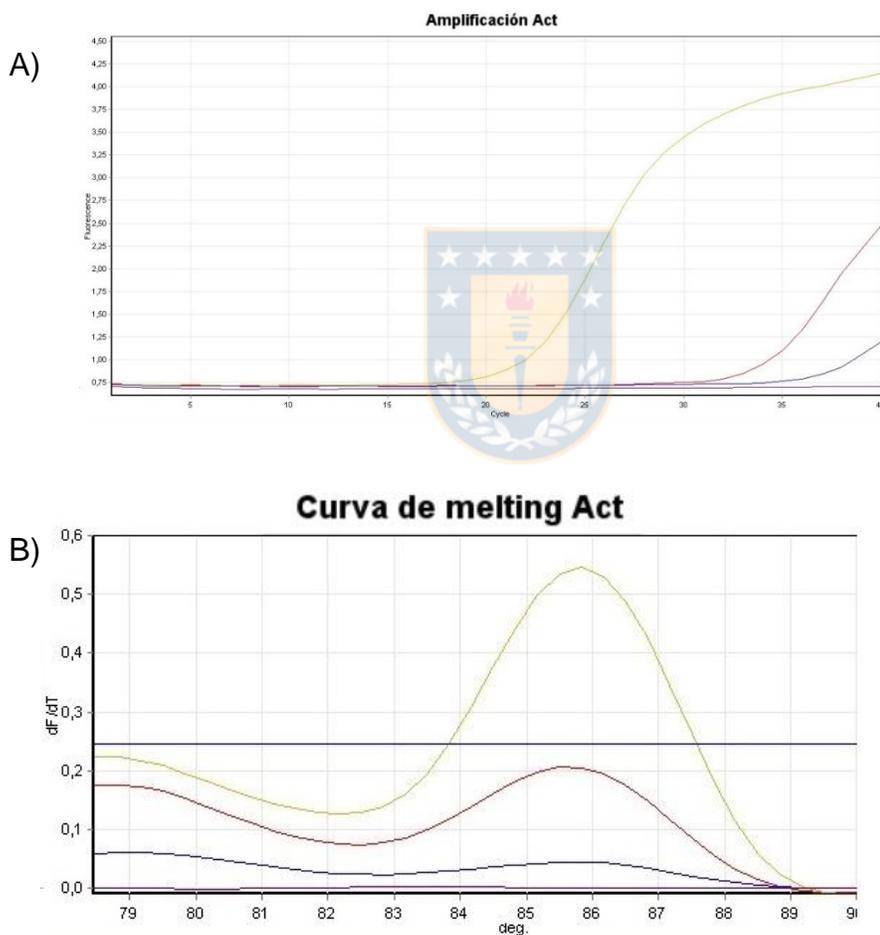


Figura 2-4: Perfil de amplificación del gen de referencia Act, n=3. A) Amplificación de Act. B) Curva de amplificación del gen.

5.3.2. Efecto del paracetamol en la expresión de HR96 mRNA.

El gen HR96 fue amplificado y analizado su perfil de expresión en la figura 5, obteniendo resultados positivos para analizar la modificación de este gen en los grupos generacionales de *D. magna*, donde en puede observar en B) se puede determinar que no la amplificación fue específica, sin productos secundarios ni dímeros entre sus partidores. Además, la eficiencia en C) obtenida está entre los rangos de 95 y 105%.

El perfil de expresión del gen HR96 fue analizado en la figura 5-6, en tres grupos generacionales distintos. El primero grupo se refiere a los neonatos iniciales del experimento que se mantuvieron con vida hasta el día 21 para ser procesados en el momento de la etapa adulta donde dejan de ser reproductivos. El segundo grupo se formó a partir de la primera reproducción que tuvo el grupo 1, los cuales se mantuvieron 21 días también. Mientras que el grupo 3 se formó a partir de la reproducción del día 21 del grupo 1, teóricamente la última reproducción, el cual se mantuvo igual por 21 días.

Este gen fue significativamente inhibido durante el paso de las generaciones (excepto en el grupo 3). Se puede observar un aumento gradual en la expresión del gen con el paso de las generaciones, al comparar el efecto que tuvo en los

tres grupos. La inhibición máxima se puede apreciar en el primer grupo, el cual no ha tenido exposición previa al fármaco, resultando en una disminución en su expresión genética de un 32.58%. El grupo 2, que tuvo 10 días de contacto previo en las madres, muestra aún una inhibición significativa del gen, pero muestra un incremento en comparación al primer grupo, disminuyendo su expresión en un 27.08%. El grupo 3, que tuvo 21 días de contacto previo, muestra una inducción no significativa del gen, observándose un aumento de un 9.68%.

Amplificación HR-96

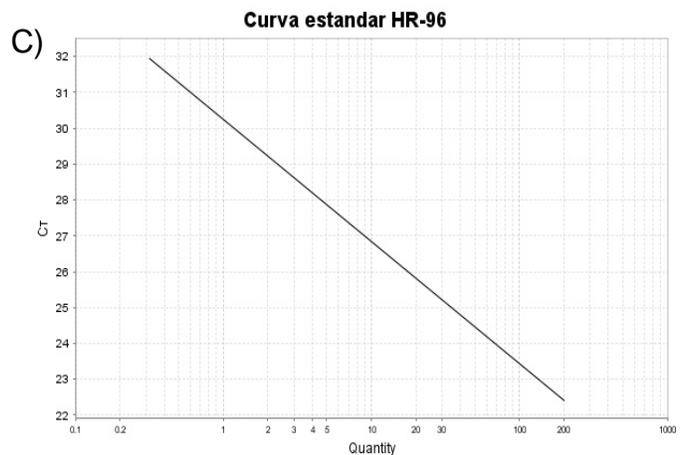
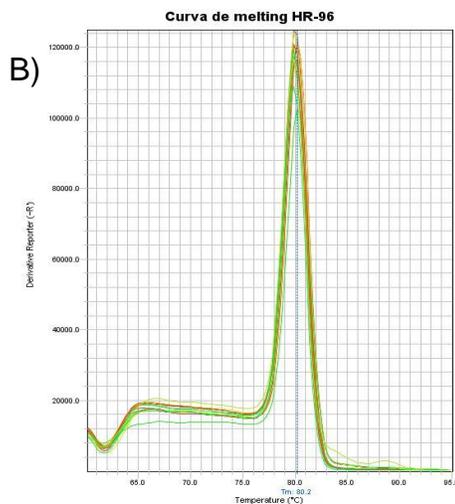
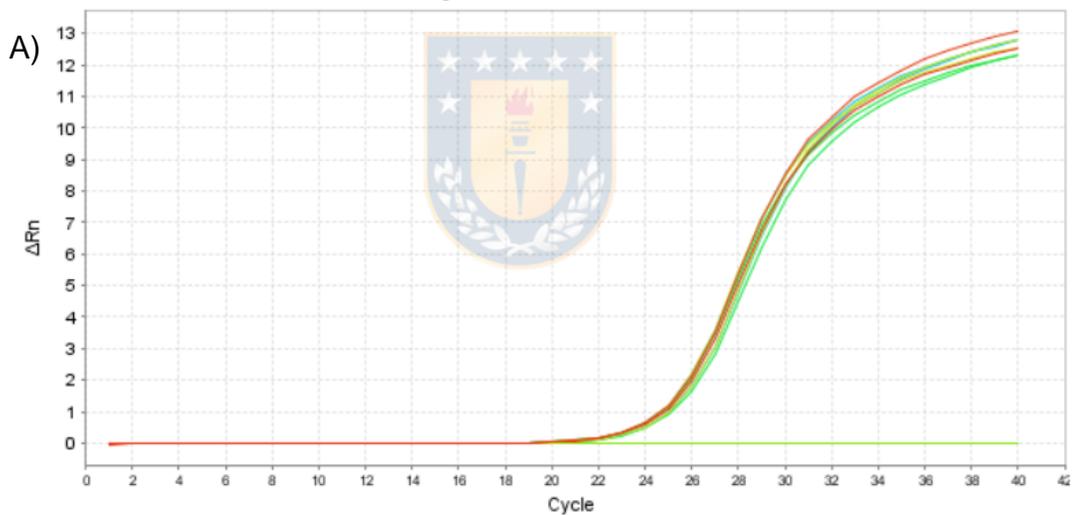


Figura 5-5: Amplificación gen HR-96. A) Curva de amplificación, n=9. B) Curva de melting constante, sin presencia de dímeros o productos secundarios. C) Curva estándar compuesta por 5 puntos con diluciones 1:3, dando una eficiencia de 96,49%.

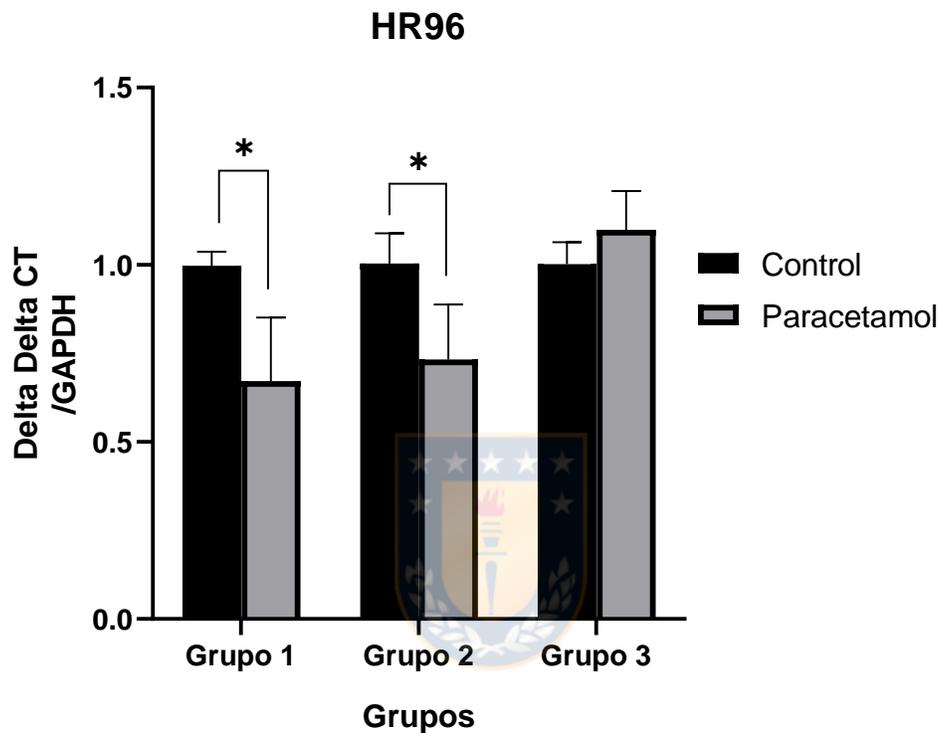


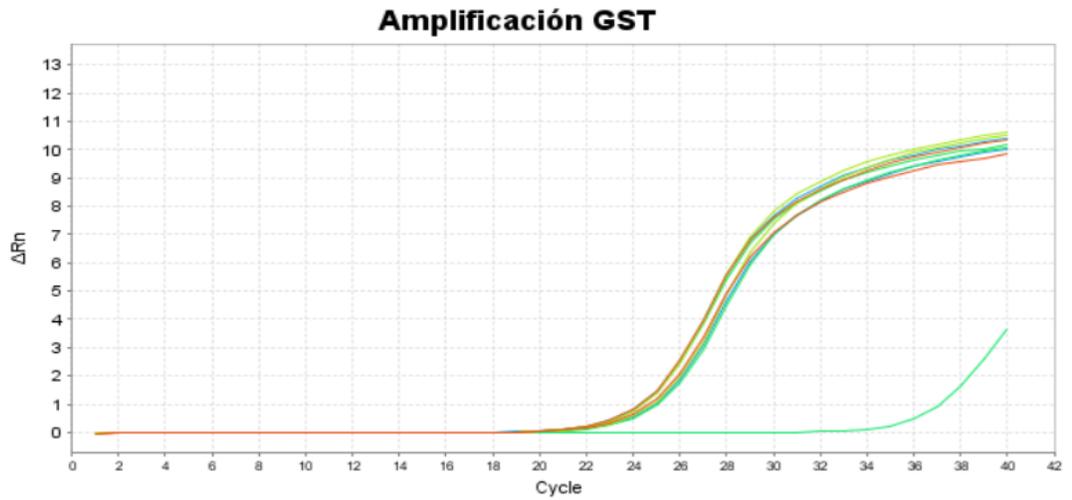
Figura 5-6: Modificación genética del gen HR-96 en los grupos 1, 2 y 3. (Data presentada como promedio \pm SD n=18). Diferencias significativas están indicadas por un asterisco * (* Significa P<0.01). Datos normalizados por gen de referencia GAPDH

5.3.3. Efecto del paracetamol en la expresión de GST mRNA.

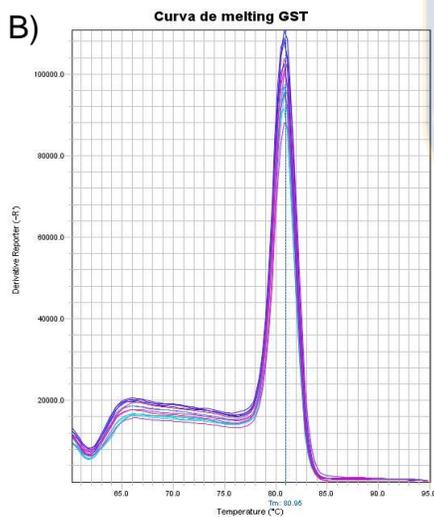
El gen GST fue amplificado y analizado su perfil de expresión en la figura 5-7, obteniendo resultados positivos para analizar la modificación de este gen en los grupos generacionales de *D. magna*, en el que la amplificación demuestra tener un producto único en su curva de melting, observándose un solo peak en ella y una eficiencia dentro del rango de 95 y 105%.

La modificación en la expresión genética de este gen puede observarse en la figura 5-8, al comparar los perfiles de expresión genética del control con el grupo expuesto a paracetamol. Luego de 21 días de exposición para los 3 grupos, la expresión genética fue significativamente inhibido para los grupos 1 y 2, mientras el grupo 3 tuvo contrariamente una inducción significativa. El grupo 1 disminuyó la expresión del gen en un 33.22%, el grupo 2 disminuyó en un 20.16% y el grupo 3 aumentó en un 13.51%.

A)



B)



C)

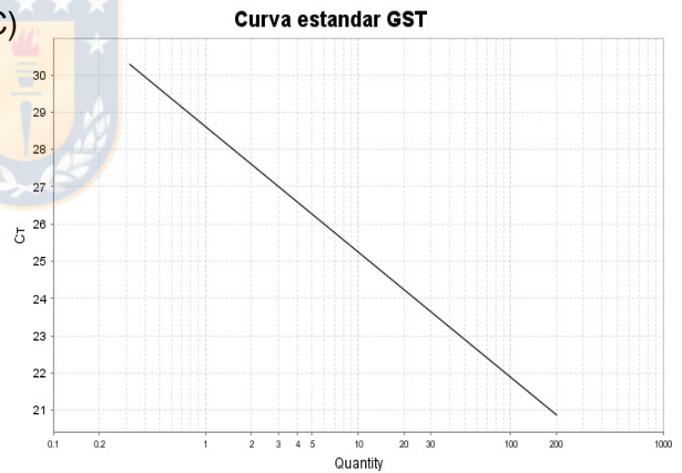


Figura 5-7: Perfil de amplificación del gen GST. A) Curva de amplificación obtenida por 40 ciclos a 52°C. n=9. B) Curva de melting con un solo peak, sin dímeros ni productos secundarios. C) se observa la curva estándar de este gen, compuesta por 5 puntos en dilución de 1:3, obteniendo una eficiencia de 98,11%.

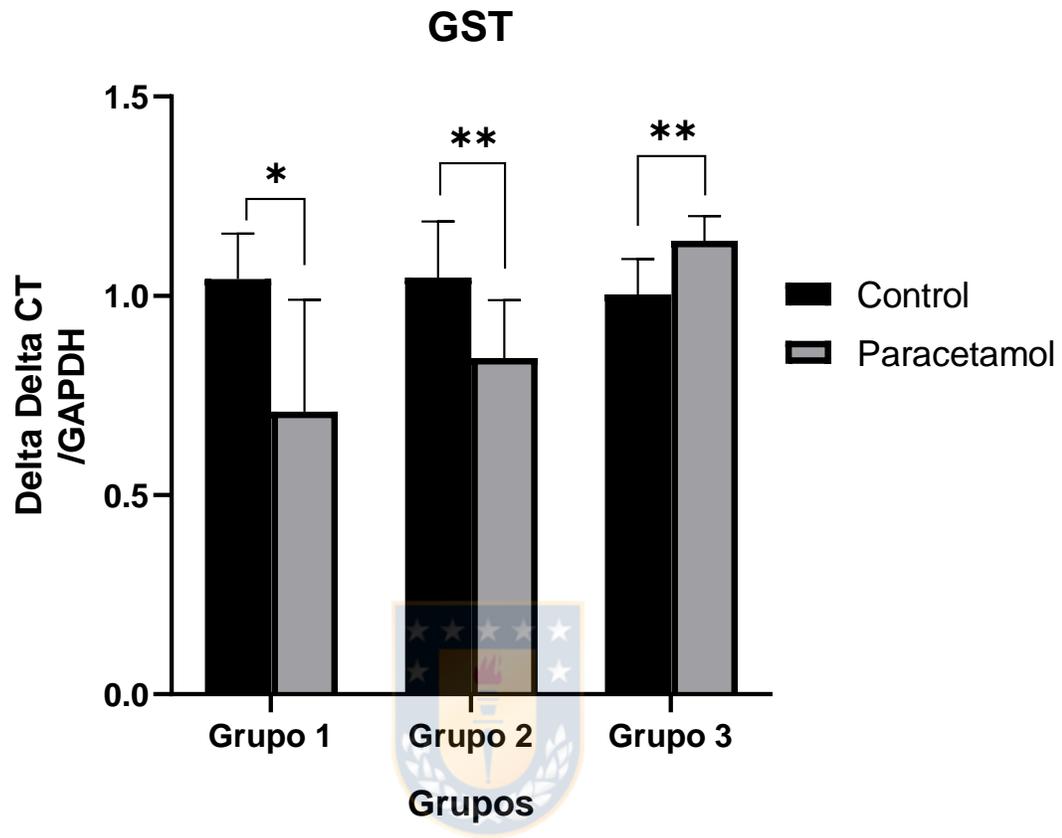
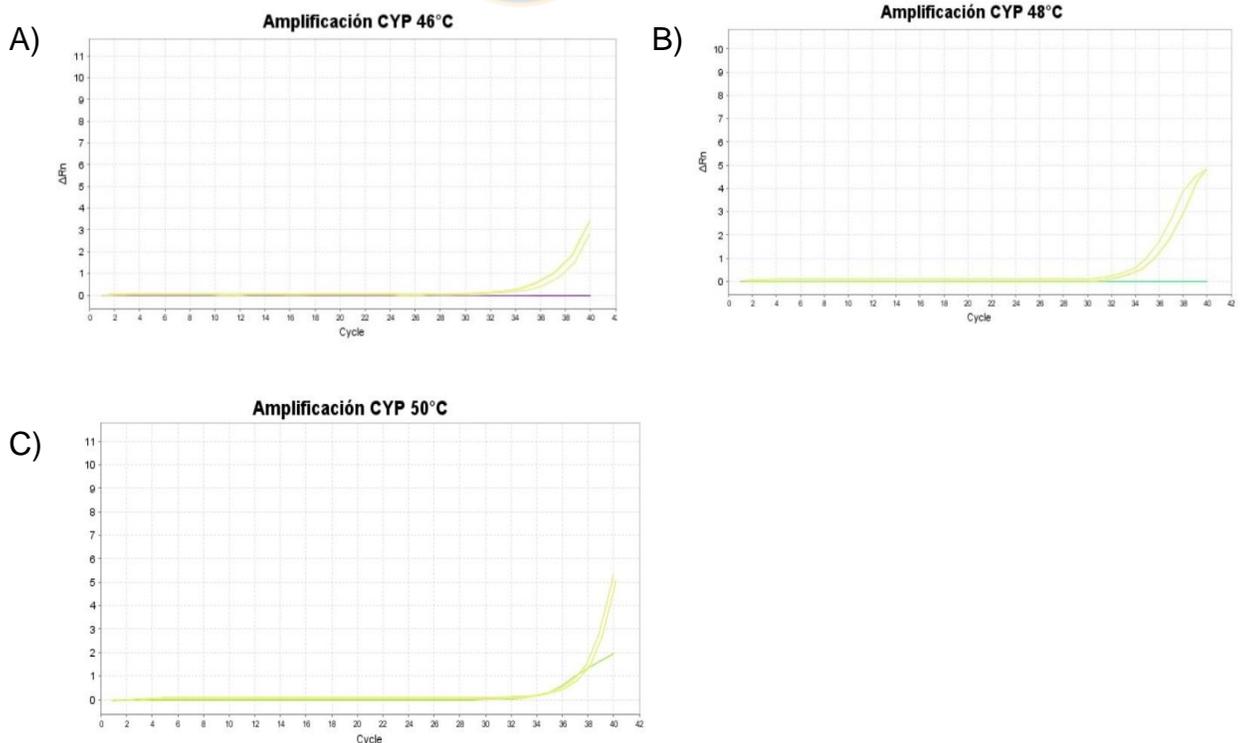


Figura 5-8: Modificación genética del gen GST en los grupos 1, 2 y 3. (Data presentada como promedio \pm SD n=18). Diferencias significativas están indicadas por un asterisco * (* significa $P < 0.05$, ** significa $P < 0.01$). Datos normalizados por gen de referencia GAPDH.

5.3.4. Efecto del paracetamol en la expresión de CYP314 mRNA.

La amplificación de este gen no fue posible realizarse con éxito luego de realizar varias pruebas. En la figura 5-9 se muestran las distintas temperaturas que se trataron, en las que no se logró obtener resultados positivos para este gen, mostrando una débil amplificación en los ciclos finales, que podía no ser el producto buscado. Al observar la curva de melting se pudo determinar que hay más de un peak en ella, por lo tanto, en se están produciendo dos productos distintos, siendo el más pequeño un posible dímero de los partidores o un producto secundario no específico. En el perfil de C) de la figura 5-9 se puede observar un alta amplificación pasado el ciclo 38.



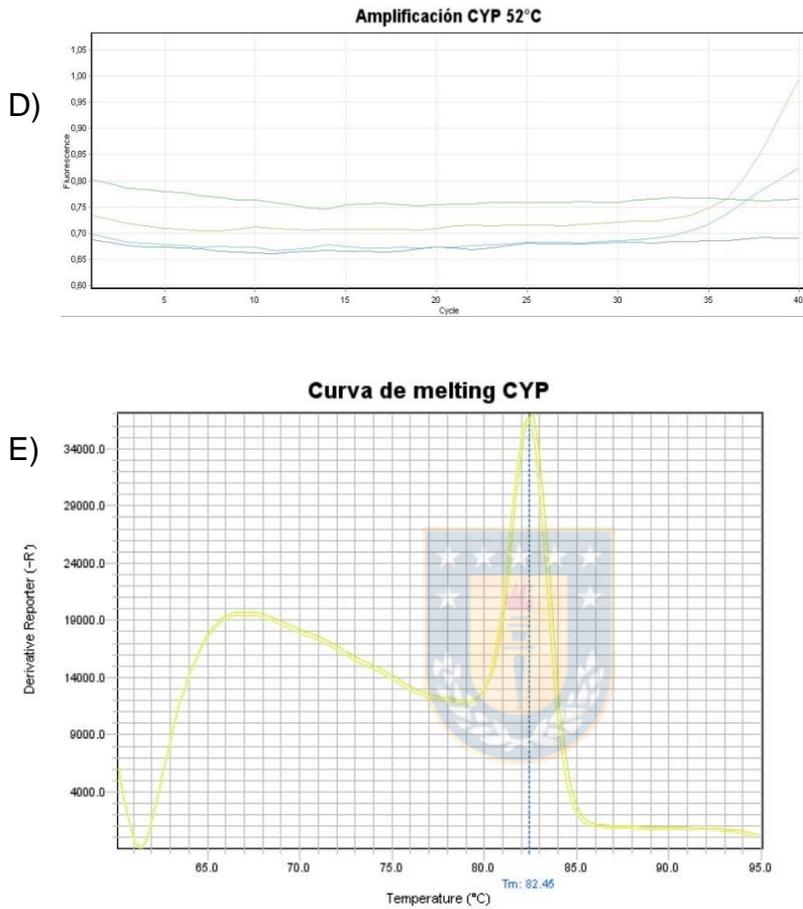


Figura 5-9: Amplificación del gen CYP 314 en gradiente de temperatura de 46°C a 52°C con 100 ng/μL de cDNA. A) amplificación a 46°C, n=2 con negativo. B) Amplificación a 48°C, n=2 con negativo. C) Amplificación a 50°C, n=2 con negativo. D) Amplificación a 52°C, n=3 con negativo. E) Curva de melting CYP 314 a 52°C, con peak principal y previo segundo peak con probabilidades de dímero o producto secundario.

6. DISCUSIÓN

6.1. Identificación molecular de *Daphnia magna*.

La identificación molecular de este organismo se realizó a través de la secuenciación de los genes anteriormente señalados 16S y 12S, que fueron establecidos como genes altamente estables y con una secuencia única para cada tipo de *Daphnia* (Zuykova et al., 2013). De ambos genes, el resultado más importante era el del gen 12S, ya que este había demostrado tener una mayor eficacia en la capacidad identificatoria de este crustáceo, aunque en este caso ambos resultados permiten tener una seguridad de casi el 100% en ambos genes.

Realizar una identificación molecular de un organismo permite tener una certeza absoluta de que se está trabajando con esa especie, ya que las identificaciones morfológicas permiten un rango de error mayor, al depender de una buena observación y un ojo entrenado en el caso de crustáceos tan pequeños como lo es este. Este tipo de identificación permite eliminar la presencia de un observador experimentado o factores fisiológicos del animal, como que tenga mal formaciones que no permita una correcta observación, o que el microscopio o lupa utilizada esté en malas condiciones lo que no permita una buena

identificación y produzca errores al hacerla(Surajit et al., 2014). Por ejemplo, la identificación taxonómica de *D. magna* se realiza a través de la observación de su postabdomen, donde en su zona inferior se debe ubicar una garra postabdominal(Standard Methods, 2017). En este caso solo se necesita asegurarse de que el producto amplificado sea el correcto, lo que fácilmente puede visualizarse a través de un gel de agarosa con un marcador de pares de bases que contenga entre sus rangos el tamaño buscado.

6.2. Concentración letal y subletal de paracetamol.



Los resultados obtenidos de este bioensayo muestran un rango de concentraciones letal menor a los informados en publicaciones anteriores de distintos autores, informando valores de LC50 de 2,99 mg/L hasta 40 mg/L(Du et al., 2016), obteniendo en este trabajo un LC50 de 14,795 mg/L y un LC10 de 1,120. Al haberse observado esta diferencia entre los resultados obtenidos de este trabajo con los ya informados se puede determinar que el paracetamol posee una actividad tóxica en concentraciones menores a las informadas en las publicaciones que hay en este momento. Además se informa en varios países que este es uno de los medicamentos más presente en agua debido a su alto consumo a nivel mundial(Kolpin et al., 2002). Estudios en distintos seres vivos de ecosistemas acuáticos demuestra tener un efecto tóxico a nivel fisiológico

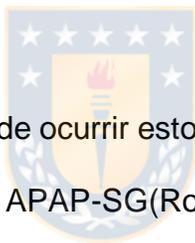
en todos los organismos testeados, causando mortalidad en ellos(*Nunes et al., 2014*) pero sin disminuir su reproducción. El daño que puede producir en el ecosistema acuático por este fármaco puede ser potencialmente alto, debido a su alta solubilidad en agua y a su fácil penetración en las células gracias al pequeño tamaño que tiene. Además, se debe recordar que todos los estudios realizados han sido realizados en condiciones de laboratorio, con paracetamol puro y sin otro compuesto en el medio, condiciones ideales que no se encuentran en el ambiente. En este se encuentra con mezclas complejas de otros compuestos farmacéuticos, productos de higiene personal, hormonas, metales pesados, pesticidas, etc(*Kolpin et al., 2002*). Lo que puede modificar el efecto de ellos o del mismo paracetamol, produciendo una potenciación de sus actividades tóxicas.

6.3. Efecto del paracetamol en expresión genética.

Cuando un organismo es expuesto a un compuesto tóxico, este responderá metabólicamente de la forma más óptima para poder eliminar y evitar el daño de este contaminante. Para poder lograr esto, activa mecanismos de detoxificación y protecciones contra el estrés que puedan provocar distintos tipos de sustancias. El paracetamol tiene una compleja actividad oxidante cuando se estudia su mecanismo de detoxificación, ya que su metabolito

conjugado NAPQI y APAP-SG (acetaminofeno glutatión conjugado) han demostrado tener distintos mecanismos tóxicos a nivel celular(Roušar et al., 2010).

Durante los últimos años se han publicado numerosos estudios sobre nuevos mecanismos por los que el paracetamol es capaz de producir daño oxidativo a nivel hepático y celular. De los genes estudiados, HR96 y GST mostraron que, en presencia de este fármaco, su expresión genética se ve inhibida en aproximadamente un 30% y que este efecto se puede mantener durante algunas generaciones hasta que se desarrolla la resistencia necesaria.



El mecanismo por el que puede ocurrir esto puede ser por los metabolitos NAPQI y el recientemente estudiado APAP-SG(Roušar et al., 2010), que indican que, el paracetamol en dosis altas o crónicas, se metaboliza en el metabolito tóxico NAPQI, el cual es conjugado por la GSH a APAP-SG. Este último al aumentar en concentración ha demostrado inhibir enzimas antioxidantes como la GSH.

Este mecanismo podría explicar el efecto contrario esperado de este fármaco, ya que estudios similares con Ibuprofeno y diclofenaco en *D.magna*, han obtenido resultados de sobreexpresión de estos genes, la cual es la respuesta esperable al poder producir estrés oxidativo estos compuestos. Sin embargo, el mecanismo propuesto anteriormente solo se ha estudiado en ratas, las cuales

tienen un mecanismo de detoxificación más desarrollado que el organismo tratado en este trabajo.

El gen CYP314 se intentó amplificar variando la concentración de cDNA entre 100 y 200 ng, se cambiaron las condiciones de reacción buscando una temperatura de hibridación capaz de unir los partidores a la hebra de ADN, haciendo un barrido desde 46°C hasta 52°C y aumentando la cantidad de ciclos hasta un máximo de 40 ciclos sin tener resultados positivos en ninguna de estas modificaciones.



Se realizó un BLAST a los partidores obtenidos desde bibliografía, el cual indicó que las temperaturas de fusión de ambos partidores tenían una diferencia de más de 5°C, lo cual dificulta obtener una temperatura de hibridación donde ambos partidores trabajen de manera óptima. Esto posiblemente repercutió en los resultados de la PCR obtenidos, mostrando nula amplificación en comparación con los otros dos genes tratados.

Estudios realizados de este gen han demostrado que este se ve inhibido por contaminantes farmacéuticos, presentando una relación inversa entre cantidad ROS y actividad enzimática(Wang et al., 2016). Estos estudios han demostrado que la enzima es susceptible a contaminantes ambientales y que su actividad se

ve inhibida inicialmente, pero luego logra estabilizarse, efecto que se ha podido observar en los genes que se estudiaron en este trabajo también.

Cabe resaltar que el efecto producido por el paracetamol disminuye con el paso de las generaciones, observándose que la última reproducción que tiene la primera generación, tendrá desarrollada parcial o totalmente una resistencia al estímulo que produce este compuesto. Esta es una respuesta poco estudiada en el organismo *D. magna* al tener una reproducción por partenogénesis. Este organismo, al ser un bioindicador se espera que tenga una alta estabilidad genética y que por lo tanto no traspase resistencias o cualquier tipo de modificación, teoría que ha cambiado en los últimos años gracias a nuevos estudios los que demuestran que este crustáceo tiene la capacidad de adaptarse y traspasar resistencias a sus próximas generaciones.

En cuanto a los genes de referencia utilizados en este trabajo, ambos fueron obtenidos de bibliografía en la que se trabajó igual con compuestos farmacéuticos(Liu et al., 2017), al igual que de una lista publicada con los genes más estables para el organismo de prueba *D. magna*, los cuales eran posibles usarlos como genes de referencia(Heckmann et al., 2006), de los cuales solo el GAPDH resultó ser capaz de mantener su perfil de amplificación estable frente al efecto del paracetamol. El perfil de la Actina se vio modificado por la acción del

paracetamol, posiblemente por el efecto inhibitorio a nivel de expresión genética que se ha estado observando últimamente en este compuesto.



7. CONCLUSIONES

Según lo analizado en esta investigación, se puede concluir que el paracetamol tiene un efecto tóxico inhibitor en la expresión genética de los genes de detoxificación HR96 y GST, sin haberse podido obtener resultados positivos en la expresión genética del gen CYP 314, permitiendo así aceptar la hipótesis realizada en este trabajo, que el paracetamol tendría un efecto modificador en la expresión de estos genes.



El efecto que presentó tener el paracetamol se puede describir como una inhibición aguda en el tiempo, donde la disminución en la expresión genética obtenida de ambos genes fue estadísticamente significativa, observándose en el último grupo un aumento en su expresión, lo que puede interpretarse como una resistencia desarrollada por el organismo. Al igual, se puede observar que la primera generación expuesta tuvo un alto porcentaje de inhibición, siendo mayor a 30% en ambos genes, provocando que los organismos sean un tercio más sensible a cualquier sustancia tóxica, lo que puede conllevar a una mayor mortalidad de estos crustáceos en una etapa temprana del contaminante.

A través de los resultados, se puede interpretar que *D.magna* tiene la capacidad de entregarle a los neonatos resistencias desarrolladas o inicios de ella, al observar cómo los perfiles de expresión fueron aumentando al comparar las primeras reproducciones con las últimas de la misma población inicial. Por lo tanto, el efecto de este fármaco se verá disminuido con el paso de las generaciones, mostrando su máximo potencial inhibitorio en la primera población expuesta junto a sus primeras reproducciones, hasta que se logre desarrollar una respuesta del organismo que sea capaz de contrarrestar el efecto del paracetamol.



Se deben realizar más estudios con estos nuevos contaminantes como son los compuestos farmacéuticos, realizando mezclas complejas entre ellos o con otros contaminantes presentes en los sistemas acuáticos para así poder determinar que actividad desarrollan, ya que todos estos contaminantes están juntos presentes en el agua y no aislados. El daño que presenta el paracetamol para el ambiente no se considera como significativo ya que no disminuye la tasa de reproducción y que es posible desarrollar y traspasar verticalmente la resistencia a este compuesto, pero si se consideran todos los otros contaminantes que hay en el agua, es probable que los organismos no sean capaces de adaptarse y que su tasa de reproducción si se vea afectada. Esto puede afectar fuertemente todo el ecosistema acuático y como consecuencia todo el resto de los ecosistemas.

Por lo tanto, es necesario mejorar las formas en que se están eliminando los productos farmacéuticos, al igual que los pesticidas y productos de higiene, para que no sigan aumentando las concentraciones de estos compuestos en ecosistemas donde no deben estar presentes



8. REFERENCIAS

8711 DAPHNIA (2017) Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. DOI: 10.2105/SMWW.2882.169

Aguilera P, Ruiz M, Rocha M, Pineda B, Chánez M. (2014) PCR en tiempo real.

Barata, C., Baird, D. J., Soares, A. M. V. M. & Guilhermino L. (2001) Biochemical Factors Contributing to Response Variation among Resistant and Sensitive Clones of *Daphnia magna* Straus Exposed to Ethyl parathion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 155–163.



Barceló, L. D. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes.

Borgeraas, J., Hessen, D. O. (2002) Variations of antioxidant enzymes in *Daphnia* species and populations as related to ambient UV exposure. *Hydrobiologia* 477, 15–30.

Buser, H.-R., Poiger, T. & Müller, M. D. (1999) Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2529–2535.

Chen, K. & Zhou, J. L. (2014) Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere* 95, 604–612.

Daniel, D., Dionísio, R., de Alkimin, G. D. & Nunes, B. Acute and chronic effects of paracetamol exposure on *Daphnia magna*: how oxidative effects may modulate

responses at distinct levels of organization in a model species. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 3320–3329 (2019).

Directive, E. U. (2013). 39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Luxembourg: Official Journal of the European Union, 24.

Du, J., Mei, C.-F., Ying, G.-G., Xu, M.Y. (2016) Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 84–90.

Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M. & Harrad, S. (2017) Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* 3, 1–16.

Ebert, D., Ebert, D. (2005) Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*

Fent, K., Weston, A. A. & Caminada, D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 76, 122–159.

Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., Serrano, R. & Hernández, F. (2012) Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere* 87, 453–462.

Heckmann, L.-H. (2006) et al. Expression of target and reference genes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *BMC Genomics* 7, 175.

Hughes, S. R., Kay, P. & Brown, L. E. (2013) Global Synthesis and Critical Evaluation of Pharmaceutical Data Sets Collected from River Systems. *Environ. Sci. Technol.* 47, 661–677.

Iannacone, J. & Alvariño, L. (2009) Evaluación Del Riesgo Acuático De Siete Productos Farmacéuticos Sobre Daphnia Magna. Ecol. Apl. 8, 71.

Instituto de Salud Pública, Centro Nacional de farmacoeconomía. (2013) Revisión de la evidencia del Mercado Nacional de fármacos.

Instituto de Salud Pública. ISP advierte sobre efectos adversos de los 20 medicamentos más vendidos en Chile | Instituto de Salud Pública de Chile. Disponible en: <http://www.ispch.cl/noticia/23548>.

Instituto Nacional de Normalización. (2000) Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de Daphnia magna o Daphnia pulex (Crustaceo, Cladocera) Norma chilena oficial 2083.Of1999. 12, 23.

Karimullina, E., Li, Y., Ginjupalli, G., Baldwin, W. S. (2012) Daphnia HR96 is a Promiscuous Xenobiotic and Endobiotic Nuclear Receptor. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 116–117, 69–78.

Köhler, C. (2012) Elimination of pharmaceutical residues in biologically pre-treated hospital wastewater using advanced UV irradiation technology: A comparative assessment. J. Hazard. Mater. 239–240, 70–77.

Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M., Buxton, H. (2002) Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. Environmental Science and Technology pp 36(6): 1202-11.

Langdon, K. A., Warne, M. St. J., Smernik, R. J., Shareef, A. & Kookana, R. S. (2011) Selected personal care products and endocrine disruptors in biosolids: An Australia-wide survey. Sci. Total Environ. 409, 1075–108.

Liu, Y. (2017) Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 183, 104–113.

Marcela, D. V. (2005) Norma chilena oficial NCh409/1.Of2005. MR LAB Pontificia Universidad Católica. 13.

Metcalf, C., Miao, X., Hua, W., Letcher, R., Servos, M. (2003) Pharmaceuticals in the Canadian Environment. *Pharmaceuticals in the Environment* pp 67-90.

Ministerio de obras Públicas. (1978) Norma chilena oficial N°1333

Ministerio de Salud. (2009-2010) Encuesta Nacional de Salud ENS Chile. 1064

Ministerio de Salud. (2012) CIRCULAR B35/38 Instrucciones para el adecuado proceso de eliminación de residuos de medicamentos en mal estado. Subsecretaría de Salud Pública.

Mullis, K. B. (1990) The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.* 262, 56–65.

Nikolaou, A., Meric, S. & Fatta, D.(2007) Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1225–1234.

Nunes, B., Antunes, S., Santos, J., Martins, L., Castro, B. (2014) Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 107, 178-185.

Oliveira, L., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Rocha, O. & Nunes, B. (2015) Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 119, 123–131.

Petrie, B., Barden, R. & Kasprzyk-Hordern, B. (2015) A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3–27.

Petrović, M., Gonzalez, S. & Barceló, D.(2003) Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends Anal. Chem.* 22, 685–696.

Plaa, G. L. (1982) Present status: toxic substances in the environment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 1010–1016.

Presidencia, m. s. g. d. l. (1994) ley-19300 09-mar-1994 ministerio secretaría general de la presidencia. *Ley Chile - Biblioteca del Congreso Nacional.*

Presidencia, m. S. G. D. L. (2001) dto-90 07-mar-2001 ministerio secretaría general de la presidencia. *Ley chile - biblioteca del congreso nacional.*

PubChem. Acetaminophen. Propiedades fisicoquímicas. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1983>.

Ramírez Fernández, N. A. (2017) Determinación de la ocurrencia de fármacos y aditivos en aguas del río Biobío, mediante muestreos pasivos con la utilización de SDB-RPS (styrene divinylbenzene - reversed phase sulfonate). (Universidad de Concepción).

Rewitz, K. F. & Gilbert, L. I. (2008) Daphnia Halloween genes that encode cytochrome P450s mediating the synthesis of the arthropod molting hormone: Evolutionary implications. *BMC Evol. Biol.* 8, 60. 53

Rosenfeld, P. E. & Feng, L. G. H. (2011) Emerging Contaminants. in Risks of Hazardous Wastes. 215–222

Roušar, T., Pa, P., Ku, O. & Bartoš, M. (2010) Glutathione Reductase Is Inhibited by Acetaminophen-glutathione Conjugate. *Physiological research* 59, 225-232.

Rozas, O. (2016) Organic micropollutants (OMPs) in natural waters: Oxidation by UV/H₂O₂ treatment and toxicity assessment. *Water Res.* 98, 109–118.

Sanchez B, Van der Brick J, Mann M. (2012) *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*. Bentham Publisher Science. University of Technology Sydney. Australia. 240

Sengupta, N., Gerard, P. D. & Baldwin, W. S. (2016) Perturbations in polar lipids, starvation survival and reproduction following exposure to unsaturated fatty acids or environmental toxicants in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 144, 2302–2311.

Sistemas de Tratamiento de Aguas Servidas. (2018) Superintendencia de Servicios Sanitarios Disponible en: <http://www.siss.gob.cl/586/w3-article-4373.html>.

Surajit, D., Hirak, R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S. (2014) Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Method* 103, 80-100.

Tchounwou, P., Yedjou, C., Patlolla, A., Sutton, D. (2012) Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS*. pp 101, 133–164

Utrillas, V. & José, M. (2004) Alteraciones fisiológicas en el crustáceo *Daphnia magna* por exposición a plaguicidas. 52

Veiga-Gómez, M. (2017) Identification and quantification of 12 pharmaceuticals in water collected from milking parlors: Food safety implications. *J. Dairy Sci.* 100, 3373–3383.

Wang, L., Peng, Y., Pan, B., Ku, p. (2016) Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Toxicol. Pharmacol.* pp 179, 49–56.

Wong, M. L. & Medrano, J. F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75–85.

Zupanc, M. (2013) Removal of pharmaceuticals from wastewater by biological processes, hydrodynamic cavitation and UV treatment. *Ultrason. Sonochem.* 20, 1104–1112.

Zuykova, E. I., Bochkarev, N. A. & Katokhin, A. V. (2013) Molecular genetic identification and phylogeny of *Daphnia* species (Crustacea, Cladocera) from water bodies of the Lake Chany basin. *Russ. J. Genet.* 49, 206–213.