



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, BIOLOGIA FUNCIONAL I  
ANTROPOLOGIA FISICA

Programa de Doctorado en Recursos Marinos

**Alteraciones bioquímicas y fisiológicas causadas  
por ibuprofeno y carbamazepina en juveniles de  
*Solea senegalensis*: efecto modulador de la  
temperatura**

TESIS DOCTORAL DIRIGIDA POR:

Dra. *Amparo Torreblanca Tamarit*

Dra. *Inmaculada Varó Vaello*

Amparo González Mira

Burjassot, València

Mayo, 2017



Esta Tesis se acoge al Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la Tesis Doctoral de la Universitat de València y ha sido realizada dentro del Programa de Doctorado en Recursos Marinos, regulado por el R.D. 1393/2007.

Tesis presentada por Amparo González Mira para optar al título de Doctora por la Universitat de València.

Firmado: **Amparo González Mira**

València, 31 de Mayo del 2017

TESIS DOCTORAL DIRIGIDA POR:

**Dra. Amparo Torreblanca Tamarit**

Catedrática

Facultad de Ciencias Biológicas  
Universitat de València

**Dra. Inmaculada Varó Vaello**

Científico Titular

Instituto de Acuicultura de  
Torre de la Sal- CSIC

Esta Tesis se ha realizado dentro del Proyecto DEPURAMAR (Referencia: CTM2010-16611), subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.



A mi familia



*«Vivimos en la Tierra como si tuviéramos otra a la que ir».*

Terri Swearingen



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directoras, Amparo e Inma, la oportunidad de hacer esta Tesis con ellas ya que, aun a falta de beca, han puesto a mi disposición todos los recursos de los que disponen para hacerla posible. Gracias por vuestra paciencia y consejos, por transmitirme vuestra pasión por la investigación, me habéis enseñado a mirar con otros ojos.

A Montserrat Rovira, por permitirme participar en el proyecto en el que he desarrollado mi Tesis y por su constante ayuda. Agradecer a toda la gente del departamento, por hacerme sentir siempre bienvenida. Y a José del Ramo, por todas sus ideas y consejos en el diseño y la maquetación de esta Tesis.

También me gustaría agradecer a Francisco Hontoria, Juan Carlos Navarro, Evaristo Mañanós, Miguel Ángel Montolío y Vanesa Piquer, del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS-CSIC), por todo el tiempo que estuve con ellos. Su ayuda y enseñanzas han sido imprescindibles para la realización de esta Tesis.

A todas mis amigas, por sus constantes ánimos en los momentos en los que parecía no haber luz al final del túnel. Mientras tenga amigas como vosotras, estaré agradecida con la vida. Y a Tatay, por diseñar esta maravillosa portada.

Y por supuesto a mi familia. A mis padres, por estar conmigo en cada paso y mostrarme el camino a seguir. A mi hermana Cris, por todo su apoyo y cariño; aunque no lo diga a menudo, cada gesto amable, cada favor y cada sonrisa que me dedicaste en este proceso me sirvió de combustible para continuar. Y a mis tíos y mis primos, es un orgullo para mí poder llamaros mi segunda familia.

Gracias a todos, vosotros me impulsasteis cuando tenía miedo de seguir mis sueños.



## Acrónimos más empleados

11-KT: 11-cetotestosterona	E <sub>2</sub> : estradiol
17,20β-P: 17α,20β-dihidroxi-4-pregnen-3-ona	EDAR: estaciones depuradoras de aguas residuales
AA: ácido araquidónico	EPA: ácido eicosapentaenoico
AChE: actividad acetilcolinesterasa	EROD: 7-etoxiresorufina <i>O</i> -desetilasa
A.G.: aceite de girasol	GOT: aspartato aminotransferasa
AINE: antiinflamatorios no esteroideos	GR: glutatión reductasa
ATP: adenosin trifosfato	GSH: índice gonadosomático
AVT: arginina vasotocina	GST: glutatión-S-transferasa
BFCOD: 7-benciloxi-4-trifluorometilcumarina <i>O</i> -desetilasa	HAD: hormona antidiurética
CAT: catalasa	HSI: índice hepatosomático
CbE: carboxilesterasa	HSP: proteínas de choque térmico
CBZ: carbamazepina	IB: ibuprofeno
CECOD: 3-ciano-7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilasa	IP: inyección intraperitoneal
COX: ciclooxigenasa	LDH: lactato deshidrogenasa
	LP: peroxidación lipídica
	MROD: 7-metoxiresorufina <i>O</i> -desetilasa

NADH-cit b<sub>5</sub> red: NADH-citocromo b<sub>5</sub>-reductasa

NADPH-cit c red: NADPH-citocromo P450-reductasa

NKA: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPasa

pb: pares de bases

PG: prostaglandina

Pi: fosfato inorgánico

PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

Q<sub>10</sub>: coeficiente de temperatura

RP: rendimiento proteico

T: testosterona

t-GPX: glutatión peroxidasa total

UDPGT: uridina difosfato glucuronosiltransferasa

VTG: vitelogenina

γ-GT: gamma-glutamyl transferasa

**Resumen**



Desde el desarrollo de la sociedad industrializada, un gran número de sustancias contaminantes derivadas de las actividades antropogénicas se vierten continuamente en mares y océanos. Así mismo, se está produciendo un incremento de la temperatura de las aguas como consecuencia del cambio global. El deterioro actual de los océanos, convertidos en sumideros de desechos antropogénicos, es más evidente en las zonas costeras, donde las fluctuaciones de temperatura son amplias y donde confluyen las aguas procedentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y las aguas de escorrentía. La introducción de estos contaminantes puede afectar a la fauna marina que habita las áreas próximas a los lugares de vertido. El lenguado senegalés, *Solea senegalensis*, es una especie de aguas templadas que habita áreas costeras y estuarinas, y que presenta una gran adaptabilidad a factores ambientales tales como la temperatura. De entre las sustancias químicas contaminantes que llegan al medio marino, las denominadas sustancias de preocupación emergente o «contaminantes emergentes», han adquirido una gran importancia. Los fármacos forman parte de este grupo de sustancias, y su principal característica es que han sido diseñados para ser biológicamente activos a dosis bajas. La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo estudiar el efecto de la temperatura de aclimatación sobre los enzimas antioxidantes y de biotransformación, y sobre diversos aspectos fisiológicos en juveniles de *S. senegalensis*; así como las respuestas a diferentes niveles de organización biológica tras la administración de ibuprofeno y carbamazepina, considerando el papel modulador de la temperatura de aclimatación.

Las temperaturas ensayadas fueron de 15 y 20 °C, durante un tiempo máximo de 60 días. A continuación, los fármacos fueron administrados a una dosis de 10 mg/kg de ibuprofeno y de 1 mg/kg de carbamazepina, durante un tiempo de exposición de 48 horas.

La aclimatación a la temperatura dio lugar a una variación de las actividades de algunas enzimas biotransformación (EROD, CECOD, CbE UDPGT), como estrategia de compensación térmica. Esta respuesta fue más rápida e intensa en las branquias que en el hígado. Las actividades de las enzimas antioxidantes se correlacionaron positivamente con la temperatura de aclimatación, probablemente como forma de protección ante el estrés oxidativo inducido por la temperatura. La aclimatación a la temperatura modificó las respuestas de las enzimas de biotransformación de fase I y II frente a la administración del ibuprofeno y de la carbamazepina. El proceso de osmorregulación, determinado a partir de la osmolalidad y de la actividad  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , -ATPasa, y el de excreción de residuos nitrogenados se vieron afectados por el ibuprofeno y la carbamazepina. Además, la aclimatación a la temperatura también condicionó la respuesta de la actividad  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , -ATPasa en el intestino. No obstante, la aclimatación a la temperatura tuvo un efecto por sí misma en los niveles de expresión de la isoforma  $\alpha 1a$  de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , -ATPasa en branquias. La expresión del gen de la ciclooxigenasa-2, enzima implicado en la cascada del ácido araquidónico, no se vio afectada ni por la administración de fármacos ni por la temperatura de aclimatación. Sin embargo, las variaciones de los porcentajes de ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico, revelaron un efecto derivado de la administración de carbamazepina en la composición de ácidos grasos en las branquias de *S. senegalensis*. Los niveles de esteroides sexuales no se vieron afectados por la exposición a los fármacos, aunque la disminución de los niveles

de 11-KT en los machos aclimatados a la temperatura más alta confirmó la interferencia del aumento de la temperatura del agua en los procesos reproductivos de *S. senegalensis*.

Si bien las temperaturas de aclimatación seleccionadas para nuestro estudio están dentro del rango de temperatura fisiológica óptima para *S. senegalensis*, los resultados obtenidos mostraron la existencia de una clara interacción entre los efectos producidos por la temperatura y la exposición a los fármacos. Este hecho pone de manifiesto la importancia de considerar la temperatura como un factor relevante en los estudios ecotoxicológicos.



**Índice**



<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>23</b>
1.1 Contaminación del medio marino .....	25
1.2 Origen de los compuestos farmacéuticos en el medio marino .....	26
1.3 Destino y distribución de los fármacos en el medio marino .....	33
1.4 Selección de los fármacos .....	34
1.4.1 <i>Ibuprofeno</i> .....	35
1.4.2 <i>Carbamazepina</i> .....	38
1.5 Aumento de la temperatura del agua: un cambio a nivel global .....	39
1.6 Uso de biomarcadores en ecotoxicología .....	45
1.7 Selección de la especie <i>Solea senegalensis</i> .....	47
1.8 Hipótesis y Objetivos .....	48
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
2.1 Animales experimentales.....	53
2.2 Diseño experimental .....	53
2.2.1 <i>Aclimatación a la temperatura</i> .....	53
2.2.2 <i>Exposición a los fármacos ibuprofeno y carbamazepina</i> .....	54
2.3 Toma de muestras .....	55
2.4 Determinación de las respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares .....	56
2.4.1 <i>Obtención de las fracciones subcelulares</i> .....	56
2.4.2 <i>Determinación de los enzimas de biotransformación</i> .....	58
2.4.2.1 Enzimas implicados en la fase I de la biotransformación .....	59
2.4.2.2 Enzimas implicados en la fase II de la biotransformación .....	60
2.4.3 <i>Parámetros relacionados con el estrés oxidativo</i> .....	61
2.4.3.1 Enzimas antioxidantes.....	61
2.4.3.2 Peroxidación lipídica.....	62
2.4.4 <i>Parámetros relacionados con el impulso nervioso</i> .....	63
2.4.5 <i>Parámetros plasmáticos</i> .....	63
2.4.6 <i>Parámetros relacionados con la osmorregulación</i> .....	65
2.4.6.1 Plasmáticos.....	65
2.4.6.2 Actividad Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPasa.....	65
2.4.7 <i>Parámetros relacionados con el estrés</i> .....	67
2.4.8 <i>Análisis de lípidos</i> .....	68
2.4.9 <i>Parámetros relacionados con la reproducción</i> .....	69
2.4.10 <i>Técnicas moleculares</i> .....	70

2.4.10.1 Extracción del ARN y síntesis del ADNc .....	70
2.4.10.2 Clonación molecular y preparación de las curvas estándar.....	71
2.4.10.3 Expresión de los genes de estudio.....	73
2.4.11 <i>Análisis estadístico de los datos</i> .....	75
2.4.11.1 Modulación del metabolismo de xenobióticos por la temperatura.....	75
2.4.11.2 Respuestas fisiológicas y bioquímicas frente al ibuprofeno y la carbamazepina moduladas por la temperatura .....	76
2.4.11.3 Efectos del ibuprofeno y la carbamazepina sobre el estatus osmorregulatorio, el metabolismo de lípidos y parámetros reproductivos.....	76
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>79</b>
3.1 Modulación del metabolismo de xenobióticos por la temperatura .....	81
3.1.1 <i>Parámetros biométricos y condición fisiológica</i> .....	81
3.1.2 <i>Respuestas hepáticas, musculares y branquiales</i> .....	84
3.1.3 <i>Análisis de correlación entre los parámetros hepáticos y branquiales</i> .....	96
3.2 Respuestas fisiológicas y bioquímicas frente al ibuprofeno y la carbamazepina moduladas por la temperatura.....	99
3.2.1 <i>Parámetros plasmáticos</i> .....	100
3.2.2 <i>Enzimas hepáticas</i> .....	108
3.3 Efectos del ibuprofeno y la carbamazepina sobre el estatus osmorregulatorio, el metabolismo de lípidos y parámetros reproductivos, modulados por la temperatura .....	117
3.3.1 <i>Actividad enzimática y niveles de expresión de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPasa</i> .....	117
3.3.2 <i>Metabolismo de lípidos y cascada del ácido araquidónico</i> .....	124
3.3.3 <i>Parámetros relacionados con la reproducción</i> .....	128
<b>4. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>133</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>145</b>

## **1. Introducción**



## 1.1 Contaminación del medio marino

Hasta hace unas pocas décadas, la gran extensión y profundidad de los océanos los convertían en los sumideros perfectos para todos los desechos humanos, hasta provocar su deterioro actual. Desde el desarrollo de la sociedad industrializada, un gran número de sustancias químicas contaminantes se vierten diariamente a los ecosistemas acuáticos, derivadas de las actividades antropogénicas.

La Agencia Ambiental Europea define contaminación como: «la introducción de sustancias o energía en el medio ambiente, con efectos perjudiciales de tal naturaleza que ponen en peligro la salud humana, dañan los recursos vivos y los ecosistemas, y perjudican o interfieren con los servicios y otros usos legítimos del medio ambiente». Dentro del conjunto de dichas sustancias contaminantes podemos encontrar los llamados «contaminantes clásicos», entre los que se encuentran los contaminantes orgánicos persistentes, que incluyen los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los bifenilos policlorados (PCBs), los agentes tensoactivos, los plaguicidas y las dioxinas. Los metales pesados también son vertidos al medio acuático debido tanto a procesos naturales como a procesos antropogénicos. Ambos grupos de contaminantes químicos han sido ampliamente estudiados y se han evaluados sus efectos sobre distintos grupos de organismos, incluida la fauna marina (Mearns *et al.* 2016). Este hecho ha permitido que la mayoría entren dentro del marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (2000/60/CE), que establece normas de calidad ambiental entendidas como las concentraciones máximas admisibles que no deben superarse para cada contaminante en el agua, los sedimentos y la biota.

Otro grupo de sustancias químicas ampliamente vertidas al medio marino son los llamados contaminantes de preocupación emergente, o «contaminantes emergentes», que incluyen los productos de higiene personal (PCPs), los compuestos farmacológicos activos (PhACs), los disruptores endocrinos, los retardantes de llama, los desinfectantes, las drogas de abuso, las cianotoxinas y los aditivos industriales entre otros (Vandermeersch *et al.* 2015; Sauvé y Desrosiers, 2014). La mayoría de compuestos orgánicos emergentes carecen de una legislación tanto a nivel comunitario como a nivel estatal que determine unas concentraciones mínimas para la calidad ambiental. A pesar de que este grupo de nuevos contaminantes ha atraído la atención de la comunidad científica, dando lugar a numerosos trabajos que evalúan sus efectos y el riesgo ambiental que suponen para los sistemas acuáticos, la mayoría están centrados en especies de agua dulce o en invertebrados marinos (Álvarez-Muñoz *et al.* 2015; Bartoskova *et al.* 2013; Boxall *et al.* 2014; Brandão *et al.* 2013; Chen *et al.* 2014; Connors *et al.* 2013; Gravel *et al.* 2007; Kümmerer 2009; Li *et al.* 2011; Santos *et al.* 2010; Saravanan *et al.* 2012; Vernouillet *et al.* 2010; Yu y Wu, 2015), existe escasez de información en vertebrados marinos. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de continuar con los estudios que avalen los efectos nocivos de estos nuevos contaminantes, entre los que se encuentran los compuestos farmacéuticos, en todos los niveles de la cadena trófica, y que son objeto de este estudio.

## **1.2 Origen de los compuestos farmacéuticos en el medio marino**

Los grandes avances en investigación médica producidos en las últimas décadas han llevado a un aumento de la población como consecuencia directa del consumo de nuevos medicamentos que permiten alargar la esperanza de vida. Dicho consumo se ve reflejado con mayor intensidad en los países desarrollados,

que disponen de tratamientos para casi cualquier tipo de dolencia. Periódicamente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publica un listado con las necesidades mínimas de medicamentos para un sistema básico de atención primaria a la salud, enumerando los medicamentos más eficaces, seguros y rentables para condiciones prioritarias (19th WHO Model List of Essential Medicines, 2015). Este listado se incrementa con cada actualización, manifestando la clara dependencia entre el aumento de la calidad de vida de la población y el incremento en el uso de fármacos. Cada país tiene una regulación específica sobre el uso de medicamentos, dotando a la sociedad de un instrumento institucional que garantice el abastecimiento, la dispensación y el uso de productos sanitarios, tanto para consumo humano como para consumo veterinario, de forma económica y responsable. En España, la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios (Ley 10/2013) determina las condiciones de dispensación de los fármacos en función de si están sujetos, o no, a prescripción médica. Los compuestos farmacológicos sujetos a prescripción médica son aquellos que puedan presentar algún peligro para la salud, incluso en condiciones normales de uso, los medicamentos administrados por vía parenteral o los que contengan sustancias cuya farmacodinámica necesite de más comprensión. Los fármacos no sujetos a prescripción médica son aquellos destinados a tratar dolencias comunes, o en procesos sin un diagnóstico preciso, y cuyos datos de toxicología permiten que sean empleados en el autocuidado de la salud. El autoconsumo de medicamentos en España es muy elevado, principalmente en los grupos de antibióticos, antigripales, y en primer lugar los analgésicos (Carrera-Lasfuentes *et al.* 2013).

Se estima que casi cien mil toneladas de sustancias farmacológicamente activas se emplean anualmente para tratamientos humanos o veterinarios (Corcoran *et al.* 2010; Zenker *et al.* 2014). La presencia de residuos farmacéuticos en el medio está determinada por la farmacodinámica y los procesos de biotransformación que experimente cada compuesto una vez absorbidos, siendo excretados a través de la orina y las heces como compuesto parental o como metabolito; y por la capacidad del medio receptor de dichos residuos de eliminarlos antes de que alcancen el medio ambiente. La entrada de fármacos en el medio ambiente acuático puede producirse a través de diferentes vías (Fig. 1.1). Los excedentes urbanos procedentes de las estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR) son el principal foco de entrada (Crane *et al.* 2006; Ferrari *et al.* 2003; Maranhão *et al.* 2014), seguido de la combinación de aguas no tratadas de escorrentía y los lixiviados que se generan en la ganadería al emplear medicamentos veterinarios y abonos con el objetivo de mejorar la producción (Chen *et al.* 2014). Aunque recientemente se ha demostrado que la industria farmacéutica manufacturera podría llegar a ser un foco mayor de contaminación frente al propio uso humano o veterinario de los fármacos (Kessler 2010). La industria farmacéutica opera bajo estrictas normas estatales para el tratamiento de sus aguas residuales con el objetivo de mantener los estándares de calidad necesarios en sus descargas al medio ambiente. Aun con todo, la creciente demanda de medicamentos y los enormes volúmenes de aguas residuales que producen, generan un vertido continuo que puede acumularse en la zona de descarga (Gadipelly *et al.* 2014).

Los sistemas de colectores de las zonas urbanas se encargan de recoger las aguas residuales, con los residuos farmacológicos disueltos en ellas, y las descargan en las EDAR para su posterior tratamiento de eliminación. El conjunto de EDAR en España siguen la Directiva 91/271/CEE, con las modificaciones recogidas en la Directiva 98/15/CE, por el que se establecen las normas aplicables

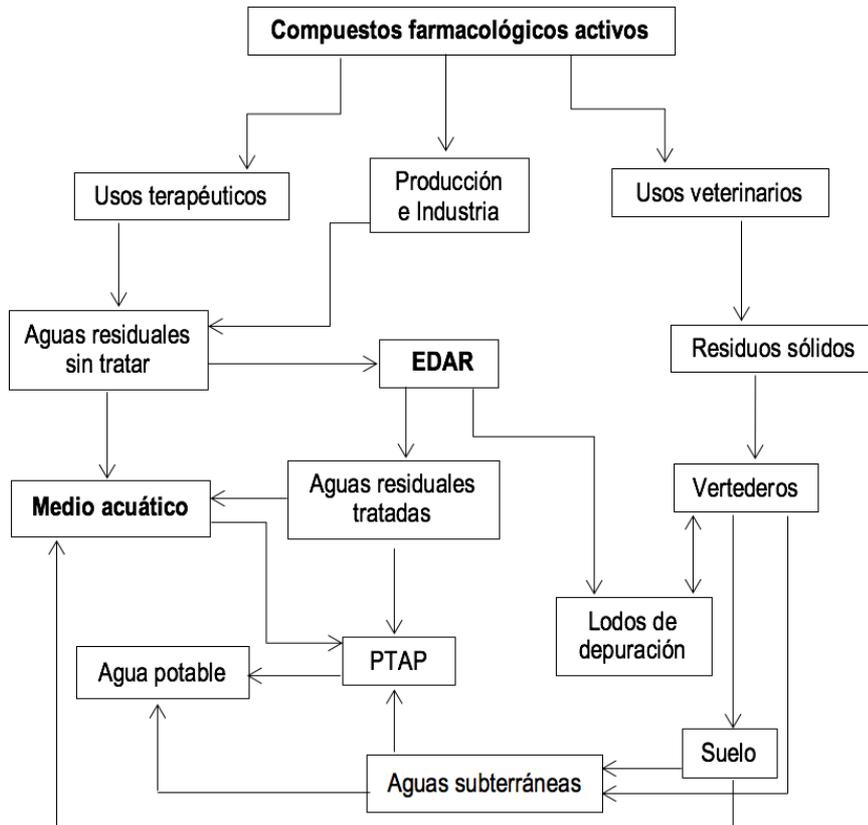


Figura 1.1. Diagrama de flujo de las vías de entrada de compuestos farmacológicos activos en el medio acuático (Adaptado de Balakrishna *et al.* 2017). PTAP: Planta de tratamiento de agua potable.

al tratamiento de las aguas residuales urbanas, imponiendo una serie de requerimientos en la depuración, en función de la localización de la zona en la que vaya a realizarse el vertido (normal, sensible, o menos sensible), y el tipo de aguas receptoras (dulces, estuarios o costeras). De acuerdo con la Directiva, los diferentes tratamientos requeridos son los que siguen: un tratamiento primario, consistente en un conjunto de procesos físico-químicos que incluya la sedimentación de sólidos y la floculación, con el objetivo de reducir hasta la mitad la materia en suspensión y hasta en una quinta parte la carga orgánica biodegradable. Este tratamiento es obligatorio previo a cualquier tipo de vertido. Un tratamiento secundario que incluya una sedimentación secundaria y la eliminación de gran parte de la materia orgánica a partir de microorganismos presentes en los fangos activos, los biodiscos, o demás técnicas, o mediante aireación, para los compuestos volátiles. Este tratamiento es obligatorio principalmente para zonas de vertido sensibles ya que elimina el riesgo de contaminación orgánica y la subsecuente eutrofización de la zona. El tratamiento terciario, más riguroso, tiene la finalidad de mejorar la calidad del efluente de manera que cumpla cualquier norma en materia de calidad de aguas. Los procesos más comunes son de naturaleza físico-química e incluyen la desinfección, mediante cloración, radiación UV u ozonización, la ósmosis inversa y la utilización de membranas cerámicas, entre otros. Este tratamiento se emplea únicamente cuando el vertido va a realizarse en zonas sensibles, o cuando el efluente va destinado a la reutilización.

Con el objetivo de unificar las actuaciones en materia de calidad y gestión de las aguas en la Unión Europea se creó la Directiva Marco del Agua (2000/60/CEE). Dentro de las diferentes estrategias elaboradas para proteger los

recursos hídricos de cada país de la Unión, la Directiva 2013/39/UE establece unas Normas de Calidad Ambiental (NCA) en las que se incluyen la carga máxima admisible y la media anual máxima, en aguas superficiales, de una serie de sustancias prioritarias consideradas emergentes. Esta Directiva reconoce que la contaminación con sustancias farmacológicamente activas es un problema ambiental grave, y establece la necesidad de evaluar los efectos tóxicos medioambientales de dichas sustancias. También se creó una Lista de Observación de otras sustancias que eran susceptibles de ser reguladas por el riesgo medioambiental que suponen, con el objetivo de facilitar la recogida de datos sobre su toxicidad. En la Decisión de Ejecución (UE) 2015/495 se incorporan por primera vez a la Directiva de NCA sustancias farmacológicas, en concreto algunos compuestos de estradiol, el antiinflamatorio diclofenaco y algunos antibióticos de uso humano y veterinario.

Sin embargo, la carga máxima de vertido al medio ambiente a través de los efluentes municipales de la gran mayoría de productos farmacológicos activos sigue sin estar legislada, y muchas instalaciones de depuración no cuentan con las tecnologías necesarias para hacer frente a una eliminación eficiente de los mismos. En consecuencia, han surgido numerosos estudios centrados en hallar las técnicas más efectivas y rentables para reducir al máximo las concentraciones de fármacos tras su paso por las EDAR. Algunos trabajos se basan en la eficacia de los procesos de oxidación avanzada, como la oxidación electroquímica (Babu *et al.* 2009) o la fotocátalisis con TiO<sub>2</sub> (Rimoldi *et al.* 2017). Otros métodos analizados emplean nanomateriales para eliminar compuestos farmacológicos activos, trabajo compilado en una completa revisión llevada a cabo por Cincinelli *et al.* (2015). Los procesos biológicos, de cavitación hidrodinámica y de radiación

UV se propusieron con éxito en sus resultados (Zupanc *et al.* 2013), al igual que la creación de mecanismos que emplean la membrana de la cáscara de huevo como material adsorbente de moléculas activas (Momenbeik y Riahi, 2014). El uso de radiación gamma y de rayos láser también ha sido estudiado y propuesto como alternativa para eliminar estos compuestos (Sánchez-Polo *et al.* 2009; Smarandache *et al.* 2012).

La detección y cuantificación de un número cada vez mayor de sustancias en el agua ha sido posible gracias al avance de las técnicas químicas analíticas. La presencia de sustancias farmacológicas en las aguas procedentes de plantas depuradoras se ha incrementado exponencialmente durante las últimas décadas, convirtiéndolas en un problema medioambiental actual (Boix *et al.* 2016; Daughton 2016; Gómez *et al.* 2007; Heberer 2002a). Se ha demostrado científicamente que los tratamientos convencionales empleados en las EDAR pueden eliminar en cierta proporción las sustancias farmacológicas activas (Boix *et al.* 2016). Sin embargo, la farmacocinética de estos compuestos y su continua difusión al medio acuático hace que actúen como contaminantes «semi-persistentes», permaneciendo disueltos en la columna de agua o adsorbidos en el sedimento (Blair *et al.* 2015; Chen *et al.* 2014). Muchos estudios de campo han analizado la presencia y la distribución de productos farmacológicos activos en las aguas superficiales de muchos países, incluidos los de la cuenca Mediterránea (Alygizakis *et al.* 2016; Andreu *et al.* 2016; Moreno-González *et al.* 2015; Santos *et al.* 2009; Vazquez-Roig *et al.* 2011; Weigel *et al.* 2004). Algunos de estos estudios han cuantificado también la carga farmacológica en los efluentes de las EDAR cercanas a las zonas de descarga (Balakrishna *et al.* 2017; Behera *et al.* 2011; Fenet *et al.* 2012; Gros *et al.* 2017; Gros *et al.* 2010; Heberer 2002b;

K'oreje *et al.* 2012; Madikizela *et al.* 2017; Santos *et al.* 2009; Yan *et al.* 2014). Por otro lado, otros trabajos se han centrado en la identificación de estos compuestos en diversos tejidos de organismos que habitan estas áreas receptoras de vertidos (Álvarez-Muñoz *et al.* 2015, 2014; Mezzelani *et al.* 2016; Moreno-González *et al.* 2016; Ramirez *et al.* 2007; Yu y Wu 2015). A pesar de que las cantidades cuantificadas en el medio acuático y en los efluentes se encuentran en el rango de los ng/l y los µg/l, los compuestos farmacéuticos están diseñados para ser biológicamente activos en unas concentraciones muy bajas (Arnold *et al.* 2014), y no se conoce en profundidad los efectos que pueden tener al acumularse en zonas costeras y bioacumularse en los organismos, o si puede producirse algún tipo de sinergismo entre ellos (Vernouillet *et al.* 2010).

### **1.3 Destino y distribución de los fármacos en el medio marino**

La principal vía de entrada de fármacos en el medio marino es a través de los vertidos de aguas residuales, aunque esta entrada puede verse agravada por el aumento de la escorrentía y la lixiviación en las zonas de ganadería en momentos puntuales de fuertes lluvias. Los vertidos en el mar se realizan mediante emisarios submarinos. Éstos transportan el agua procedente de las EDAR hasta alcanzar la distancia necesaria, en la que se dispersa mediante varios difusores, para que el vertido se mezcle con el agua de mar de manera eficiente ayudado por las corrientes. El éxito de la dilución final viene determinado por multitud de variables, tanto físicas como químicas. Es necesario tener en cuenta los datos batimétricos y geofísicos del área de vertido para maximizar su dilución, al igual que la dinámica marina de la zona, puesto que puede producirse un efecto de retorno de la pluma vertida a la costa.

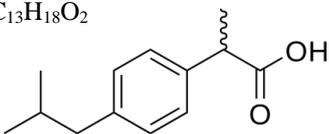
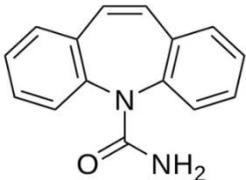
Es importante tener en cuenta las propiedades intrínsecas de cada fármaco, ya que éstas determinarán su comportamiento en el medio ambiente. Una vez alcanzan el medio marino, los compuestos farmacéuticos sufrirán procesos de degradación, tanto química como biológica, pudiendo dar lugar a la aparición de metabolitos y conjugados, en muchas veces con mayor actividad biológica que el compuesto original, como sucede con la carbamazepina (Thorn *et al.* 2011). En algunas ocasiones puede producirse un cambio en la distribución del compuesto una vez alcanza el agua, por lo que es necesario contemplar el grado de lipofilia para predecir una posible adsorción al sedimento, modificando la biodisponibilidad del compuesto. Para ello existen varios índices, siendo el coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) uno de los más empleados en lo referente a compuestos farmacéuticos. En general se admite que valores de logaritmo del  $K_{ow}$  por encima de 3,5 indican un alto grado de lipofilia del compuesto, lo que conllevaría a una alta tasa de acumulación en organismo acuáticos (Kümmerer, 2009).

#### **1.4 Selección de los fármacos**

Los fármacos elegidos para este trabajo son el ibuprofeno (IB) y la carbamazepina (CBZ). En la Tabla 1.1 se muestran algunas de las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, que determinarán su distribución en el medio marino una vez vertidos. La selección de estos fármacos está principalmente basada en sus altas tasas de consumo y a su condición de medicamentos esenciales para un cuidado médico básico según la OMS (19th Who Model List of Essential Medicines, 2015). Numerosos trabajos de campo han informado de la presencia de IB y CBZ en ecosistemas acuáticos de diferentes partes del mundo, remarcando su persistencia en el medio (Alygizakis *et al.* 2016; Andreu *et al.*

2016; Moreno-González *et al.* 2015; Santos *et al.* 2009; Thomas y Foster 2004; Vazquez-Roig *et al.* 2011; Weigel *et al.* 2004). Así mismo, otros trabajos han detectado concentraciones cuantificables de dichos fármacos y de sus metabolitos en diferentes tejidos de organismos capturados en áreas de influencia de vertidos de aguas residuales (Álvarez-Muñoz *et al.* 2015, 2014; Klosterhaus *et al.* 2013; Martínez Bueno *et al.* 2013; Mezzelani *et al.* 2016; Moreno-González *et al.* 2016; Ramirez *et al.* 2007; Tanoue *et al.* 2014; Yu y Wu 2015).

Tabla 1.1. Estructura química y propiedades fisicoquímicas de los fármacos seleccionados.

Compuesto	Estructura química y fórmula	M (g/mol)	Solubilidad (mg/l)	Log K <sub>ow</sub>
Ibuprofeno	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> 	206,3	58	3,71
Carbamazepina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O 	236,3	17,7	2,45

#### 1.4.1 Ibuprofeno

El IB pertenece a un grupo de medicamentos denominados antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Es uno de los grupos de fármacos de uso más extendido, con actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria, indicado para tratar una larga serie de síntomas inespecíficos, como los de los procesos

reumáticos, lesiones en tejidos blandos, en procesos dolorosos de intensidad leve o moderada (dismenorrea, migrañas, postoperatorios, etc) y episodios febriles de causas diversas. Este fármaco puede adquirirse sin prescripción médica, por lo que es habitual que la gente recurra a su consumo en momentos de autocuidado de la salud.

El mecanismo de acción del ibuprofeno, como el de todos los AINEs, es la inhibición competitiva y no-específica de las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2), enzimas que catalizan la generación de prostaglandinas (PGs), presentes en casi todos los tejidos (López-Rodríguez *et al.* 2008; Patrignani y Patrono, 2015). Dicha inhibición es temporal y reversible en el momento en el que se elimina el compuesto del sistema (Blobaum y Marnett, 2007). Las PGs son mediadores celulares que derivan del metabolismo del ácido araquidónico (20:4n-6, AA). Esta ruta metabólica es conocida como «la cascada del AA» (Fig. 1.2), y comienza con la acción de la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), encargada de liberar los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas celulares (Patrignani y Patrono, 2015; Smith, 1989). Se ha demostrado que el IB no solo interfiere en la síntesis de PGs inhibiendo su enzima catalizadora, sino que también actúa directamente en los primeros pasos de su metabolismo, modificando la actividad de la enzima PLA<sub>2</sub> (Gaspar *et al.* 2010). En mamíferos, las PGs tienen un sinnúmero de funciones fisiológicas, como la protección de la mucosa gástrica, acción vasodilatadora, aumentar la permeabilidad de tejidos, regular la presión sanguínea y regular funciones reproductoras, entre otras. En teleosteos marinos, varios estudios han demostrado la gran relevancia de las PGs tanto en los mecanismos de osmorregulación (Borsick *et al.* 2006; Choe *et al.* 2006; Grosser *et al.* 2002; Van Praag *et al.* 1987), como en diferentes procesos de

reproducción (Fujimori *et al.* 2011; Lister y Van Der Kraak, 2008; Norambuena *et al.* 2012; Sorensen y Goetz, 1993).

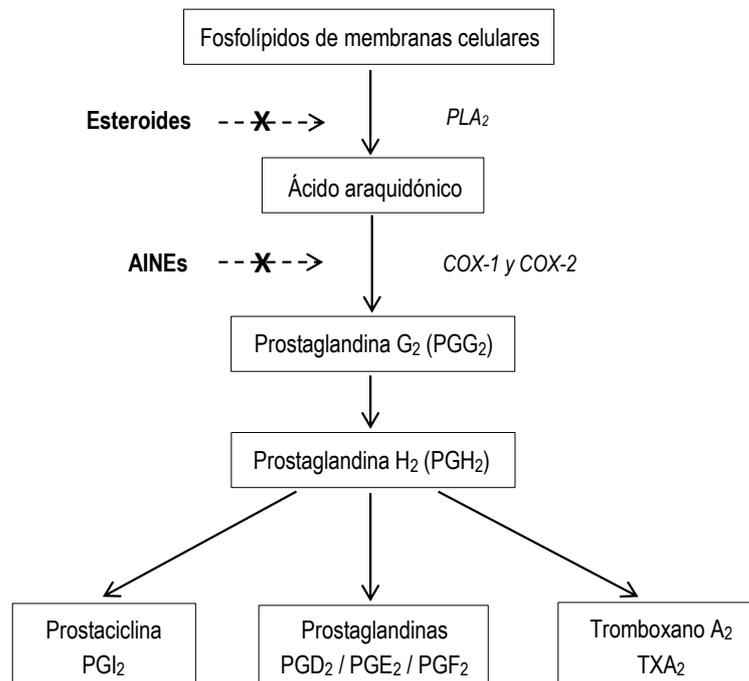


Figura 1.2. Cascada del AA. Ruta metabólica de la síntesis de PGs.

El IB es comercializado y administrado como mezcla racémica de dos enantiómeros, S (+)- y R (-)-ibuprofeno. La actividad farmacológica del IB es altamente dependiente de la quiralidad de la molécula, siendo el enantiómero S (+)- el que posee las propiedades farmacológicas más potentes (Rainsford 2012). En humanos se ha demostrado que, una vez en el organismo, parte del enantiómero R (-) sufre una conversión quiral a S (+)- (Rudy *et al.* 1991). Según algunos estudios, dicha conversión tiene su máximo durante la fase de absorción del fármaco, sugiriendo una posible participación de procesos presistémicos (Jamali *et al.* 1988). Parte de la toxicidad del ibuprofeno puede estar relacionada

con la conversión quiral, ya que se generan ciertos compuestos intermedios que pueden afectar al metabolismo lipídico (Averginos y Hutt, 1990).

En mamíferos, el IB es metabolizado en el hígado a través de procesos de biotransformación de fase I mediados por el citocromo P450 (CYP) 2C9 y 2C8 (hydroxy-ibuprofeno), seguidos de procesos de fase II de conjugación con el ácido glucurónico (acyl-glucuronidos) (Rainsford 2012). Este compuesto tiene una rápida tasa de degradación en el organismo, y su vida media biológica es de 2 a 3 horas, aproximadamente, y es excretado por las heces y la orina. Aunque el IB puede ser eliminado hasta en un 90% durante los tratamientos convencionales de las EDARs (Thomas y Foster 2004), una vez vertido al medio ambiente puede permanecer activo durante 20 días (Boxall *et al.* 2014).

#### 1.4.2. Carbamazepina

La CBZ es un fármaco anticonvulsivo que actúa inhibiendo la subunidad  $\alpha$ - de los canales de sodio dependientes de voltaje, bloqueando la propagación del impulso nervioso en las células nerviosas despolarizadas (Tate *et al.* 2005). Es empleado para tratar varios tipos de enfermedades, desde la epilepsia, y la neuralgia trigeminal, hasta enfermedades mentales, como el trastorno bipolar y la depresión (Ambrósio *et al.* 2002; Bertilsson 1978; Chen y Lin, 2012).

En humanos, la CBZ es metabolizada en el hígado por la enzima CYP3A4 antes de ser excretada por la orina. Se ha demostrado que el metabolito resultante de la biotransformación, la carbamazepina-10,11-epóxido, presenta una actividad farmacológica mucho mayor que el compuesto parental, lo que puede aumentar el riesgo para el medio ambiente (Thorn *et al.* 2011). La vida media biológica de la CBZ dentro del organismo es de 35 horas (Bertilsson 1978), y su tasa de

eliminación en las EDAR no suele superar el 10% (Heberer 2002b), pudiendo permanecer activa en el agua hasta 100 días después de ser introducida (Boxall *et al.* 2014). La gran persistencia y la ubicuidad de la CBZ en los ecosistemas acuáticos la convierten en una gran candidata para emplearse como marcador de contaminación antropológica (Clara *et al.* 2004).

### **1.5 Aumento de la temperatura del agua: un cambio a nivel global**

El V Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, 2014, Suiza) ofrece una panorámica global sobre el estado actual del clima, los cambios observados en las últimas décadas y las previsiones futuras que dichos cambios podrían acarrear si se continúa con la tendencia actual. Este informe concluye que ha quedado demostrada la relación directa existente entre el aumento en las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero con los cambios climáticos globales encontrados en las últimas décadas. El calentamiento de la atmósfera y de los océanos es inequívoco, y los impactos generados sobre los sistemas naturales no tienen precedentes históricos, poniendo de manifiesto la gran sensibilidad de dichos sistemas al cambio climático global.

Siguiendo los modelos de predicción creados a partir de las tendencias recogidas en el registro histórico de temperaturas, el IPCC (2014) ha proyectado distintos escenarios con cambios en la temperatura media atmosférica de hasta 5 °C para finales del siglo XXI. Debido a los procesos de equilibrio que se generan entre atmósfera y superficie terrestre, los océanos son los principales encargados de absorber y almacenar la mayor parte de la energía que se acumula en la atmósfera (Abraham *et al.* 2013), provocando el calentamiento de los

océanos. El informe del IPCC (2014) estima un aumento de la temperatura superficial de las aguas oceánicas de 2 °C durante lo que resta de siglo, con altas variabilidades regionales. Este aumento en la temperatura del agua puede resultar en un cambio de las corrientes termohalinas. Estas grandes corrientes oceánicas ayudan a determinar el clima de las diferentes zonas del planeta, y un cambio en las mismas desencadenaría consecuencias catastróficas a diferentes niveles. Las proyecciones recogidas por los Grupos de Trabajo del IPCC (2014) también apuntan a una reducción del hielo marino y de las extensiones de permafrost (capa de suelo en permanente estado de congelación) en latitudes septentrionales, lo que desencadenaría un aumento en el nivel del agua y mayores emisiones de gases de efecto invernadero almacenados en el hielo.

El aumento en la temperatura también produce cambios en las propiedades biogeoquímicas del agua de mares y océanos. Los océanos actúan como grandes almacenes y sumideros de carbono, manteniendo un delicado equilibrio entre el aire y la superficie del agua. La difusión pasiva y continua de CO<sub>2</sub> antropogénico desde la atmósfera a los sistemas acuáticos puede provocar una disminución del pH global del agua, modificando la solubilidad de los gases, y reduciendo la cantidad de CO<sub>2</sub> que los océanos son capaces de absorber de la atmósfera, lo que provocaría una retroalimentación del calentamiento global, de forma indirecta (IPCC, 2014). Otros efectos de la elevación de la temperatura del agua son la reducción de la solubilidad del O<sub>2</sub> y los cambios en la estratificación vertical de la columna de agua, lo que dificulta el transporte de oxígeno hacia aguas más profundas (Deutsch *et al.* 2005; Frölicher *et al.* 2009). Es por ello que los organismos marinos se verán confrontados gradualmente a situaciones de reducción de oxígeno disponible, a mayores tasas de acidificación oceánica, y a

todos los riesgos que se vean agravados por el aumento de las temperaturas oceánicas, como la redistribución global de las especies marinas y la reducción de la biodiversidad.

Cabe destacar que la gran mayoría de organismos que habitan el ecosistema marino son ectotermos. En los ectotermos acuáticos, como los peces, la temperatura corporal depende fundamentalmente de la capacidad de alcanzar un equilibrio con el agua del entorno, aproximando casi siempre su temperatura corporal a la del agua. En estos organismos, la velocidad de su metabolismo, así como la conformación y el estado funcional de sus moléculas, se ven modificadas por cambios en la temperatura del agua circundante, por lo que deben de estar preparados para llevar a cabo dichos procesos de forma eficiente en un rango amplio de temperaturas corporales (Hill y Wyse, 1992).

De acuerdo con los textos clásicos de Fisiología Animal Comparada (Hill *et al.* 2006; Willmer *et al.* 2000; Withers 1992), a pesar de que los animales ectotermos están desprovistos de mecanismos fisiológicos que les permitan controlar su temperatura corporal de manera estable, sí que cuentan con mecanismos que les ayudan a regularla. En primer lugar, estos organismos pueden valerse de su conducta con el objetivo de regular su temperatura, mecanismo conocido como termorregulación conductual. Los peces pueden realizar migraciones verticales diarias, e incluso migraciones latitudinales, con el objetivo de regular la temperatura al cambiar su posición en la masa de agua. La principal dificultad con la que se encuentran algunos de estos organismos es que no siempre pueden escapar de la masa de agua que les rodea, por lo que quedan expuestos a las variaciones de temperatura de la misma. En segundo lugar, los ectotermos pueden responder a los cambios en el ambiente que les rodea mediante

modificaciones en su fisiología, las cuales se desarrollan a diferentes tiempos. Cuando la respuesta es inmediata, respuesta aguda, un aumento aditivo en la temperatura ambiental provoca un aumento multiplicativo en la velocidad metabólica del organismo, de forma *cuasiexponencial*. Esto se debe a que cualquier reacción está sujeta a su dependencia de la temperatura, y ésta tenderá a acelerarse a medida que se incrementa la temperatura (ley de Arrhenius). Una forma sencilla que se emplea en fisiología para explicar la relación aproximadamente exponencial entre la tasa metabólica y la temperatura ambiental es mediante el coeficiente de temperatura, o  $Q_{10}$ :

$$Q_{10} = \frac{R_T}{R_{(T-10)}}$$

donde  $R_T$  es la velocidad de la tasa metabólica a cualquier temperatura  $T$ , y  $R_{(T-10)}$  es la velocidad de la tasa metabólica a una temperatura de 10 °C menor que  $T$ . Esta fórmula pretende determinar el factor multiplicativo por el que aumentará la tasa metabólica ante un incremento predeterminado de temperatura de 10 °C. La magnitud de este coeficiente representa la sensibilidad térmica de un organismo ectotermo, es decir, cuanto mayor sea el coeficiente, más sensible es el organismo ante un cambio de temperatura. Los valores de  $Q_{10}$  para la mayoría de ectotermos suelen estar entre 2 y 3, pero dicho rango puede variar dependiendo del rango de temperaturas que se analicen, puesto que no es totalmente exponencial. Cuando se requiere de un estudio más detallado, con rango de temperaturas inferiores a 10 °C, la  $Q_{10}$  puede calcularse empleando la ecuación de van't Hoff:

$$Q_{10} = (R_2/R_1)^{10/(T_2-T_1)}$$

donde  $R_2$  es la velocidad de la tasa metabólica a una temperatura  $T_2$  en °C, y  $R_1$  es la velocidad de la tasa metabólica a una temperatura  $T_1$ , siempre inferior a  $T_2$ .

Debido a su condición de ectotermos, los peces están sujetos a lo que se conoce como la «tiranía de la ley de Arrhenius», ya que, como sistemas fisicoquímicos que son, tienen que hacer frente a la sensibilidad térmica propia de cualquier reacción. No obstante, los animales son sistemas sumamente complejos y evolucionados, por lo que se les puede presuponer una serie de mecanismos adaptativos que les permita escapar a la tiranía de la ley de Arrhenius. Estos mecanismos se producen cuando el organismo vive en un ambiente alterado durante un período más largo al descrito anteriormente, y por ello, el conjunto de respuestas fisiológicas generadas durante la fase aguda del cambio suelen modificarse y pasan a ser respuestas crónicas.

La aclimatación es uno de los mecanismos por el cual los ectotermos amortiguan las respuestas agudas a los cambios de temperatura. Durante la aclimatación se produce un proceso denominado compensación enzimática, cuyo objetivo es restaurar, en la medida de lo posible, las velocidades metabólicas alteradas por el cambio de temperatura. Para ello, la respuesta más habitual de los organismos ectotermos es la modificación de la cantidad de enzimas que sintetizan, ya que las enzimas son los componentes limitantes de las reacciones metabólicas. De esta forma, si el metabolismo se acelera a causa del incremento de la temperatura, la síntesis de enzimas se reduce para lograr compensar la actividad y devolverla a su nivel original. Además, la temperatura corporal también es responsable de la conformación y de las propiedades funcionales de las enzimas, pudiendo variar la afinidad de una enzima con su sustrato.

Puesto que las membranas biológicas juegan un papel esencial en la biología de cualquier organismo, otro mecanismo de aclimatación a la temperatura en los ectotermos implica cambios en las propiedades funcionales de los lípidos, igual que ocurre con las proteínas, con el objetivo de mantener la fluidez de las membranas. Este mecanismo es conocido como adaptación homeoviscosa, y se produce al variar la composición de las membranas a través de la movilización de los lípidos que la componen, o cambiando la cantidad de enlaces dobles (Hill *et al.* 2006).

El cambio climático también puede conllevar una alteración en la distribución de algunas enfermedades y plagas y, por consiguiente, al aumento del uso de productos farmacológicamente activos para paliarlas. El aumento de la temperatura del agua y los cambios de sus propiedades biogeoquímicas pueden tener efectos directos sobre la toxicocinética de estas sustancias, es decir, sobre su distribución y comportamiento en el medio, y sobre su toxicidad en el agua (Noyes *et al.* 2009). La condición de ectotermia de los animales marinos provoca una aceleración en su metabolismo cuando éstos están expuestos a altas temperaturas, pudiendo favorecer la entrada de estos contaminantes en el organismo y pudiendo variar su toxicodinámica (Stauber *et al.* 2016).

Los hábitats costeros, estuarinos y los humedales, son los más susceptibles de sufrir las consecuencias del cambio climático. Estas zonas, al igual que los organismos que las habitan, están en mayor situación de riesgo debido al aumento de la temperatura y del nivel del mar, y a la constante presión antropogénica a la que se ven sometidos. La alteración de estos ecosistemas a causa del aumento de la temperatura, unido al problema de la contaminación del agua, podría tener consecuencias negativas para la salud de los ecosistemas marinos.

## 1.6 Uso de biomarcadores en ecotoxicología

Desde hace varias décadas, la implementación de biomarcadores en estudios de toxicología y monitorización ambientales ha proporcionado nuevas herramientas para evaluar los efectos tóxicos de la exposición de los organismos a contaminantes químicos. Estos indicadores proporcionan información sobre los efectos tóxicos de una sustancia a diferentes niveles de organización (Tabla 1.2). Alguno de estos indicadores pueden incluso relacionarse con un efecto específico que alerte de la presencia de un tipo determinado de contaminante en el medio, herramienta muy útil en los estudios de monitorización ambiental. En el medio acuático, los estudios realizados mediante biomarcadores y utilizando exposiciones agudas o crónicas, así como diferentes vías de administración, sedimento (Maranho *et al.* 2014), alimento (Varó *et al.* 2013), disuelto en el agua (Hampel *et al.* 2014), o inyectado (Lyssimachou *et al.* 2014; Solé *et al.* 2014), han contribuido a caracterizar la toxicidad de los fármacos y sus mecanismos de actuación. Los biomarcadores se definen como alteraciones cuantificables de los procesos biológicos, inducidas sobre componentes moleculares, celulares, bioquímicos o fisiológicos, como consecuencia de la exposición a una sustancia tóxica, y la magnitud de la respuesta del organismo a dicha sustancia (van der Oost *et al.* 2003). Existe una gran variedad de biomarcadores específicos, seleccionados en función del proceso biológico que pretenda evaluarse.

Tabla 1.2. Descripción de los biomarcadores más empleados en estudios de Toxicología Ambiental, con una breve descripción de los efectos que identifican y algunos ejemplos.

Biomarcadores			
Grupo	Efectos	Biomarcadores Específicos	Ejemplos/Técnicas
Enzimas de Biotransformación	Reacciones de metabolización de un compuesto. Modifican su estructura y, con ello, su actividad biológica. Facilitan su eliminación y evitan la biocumulación en el organismo.	Enzimas de Fase I <i>oxidación, reducción e hidrólisis</i>  Enzimas de Fase II <i>conjugación</i>	Citocromo P450 ( <b>EROD, BFCOD, MROD, CECOD</b> , etc.) Sistema Monooxigenasa ( <b>NADPH, NADH</b> ) <b>CbEs</b> <b>UDPGT, GST</b>
Parámetros de Estrés Oxidativo	Cambios en el estatus redox del organismo y en la actividad de las especies reactivas del oxígeno.	Enzimas Antioxidantes Peroxidación Lipídica	ROS, <b>CAT, GPX, GR</b> , SOD, <b>LDH</b> <b>LP</b>
Reproducción y Disrupción Endocrina	Fallos en la capacidad reproductiva y la secreción hormonal.		<b>VTG, GSI, esteroides sexuales</b>
Parámetros de Osmorregulación	Fallos en los mecanismos osmorreguladores y de intercambio iónico.		<b>NKA</b> , bomba de protones, células de cloruro, <b>osmolalidad</b>
Parámetros plasmáticos	Visión global del metabolismo energético y de las funciones orgánicas.		<b>Glucosa, lactato, creatinina</b> , cortisol, <b>triglicéridos</b> , bilirrubina, <b>transaminasas</b> , <b>amonio</b> , albúmina <b>AChE, BChE</b>
Parámetros Neurotóxicos	Fallos la capacidad de transmitir impulsos nerviosos.		
Genotoxicidad	Mutaciones genéticas y celulares, alteración de cromosomas, aparición de tumores.	Genotoxicidad Irreversible Modificaciones ADN Aductos ADN	Daño de ADN, test de micronúcleos
Parámetros Inmunológicos	Disfunción inmunológica, falta de resistencia ante enfermedades.		NO, fagocitosis, secreción de lisozimas, COX, etc.
Metalotioneínas	Detoxificación de metales		MTs
Metodologías «Ómicas» y Moleculares	Alteraciones a nivel molecular, y en la cuantificación de proteínas y metabolitos específicos o de forma masiva.	Transcriptómica Proteómica Metabolómica	cDNA microarrays, PCR, <b>rt-PCR</b> <b>Western blot</b> , DIGE, iTRAQ, etc. LC-MS, GC-MS, NMR

En negrita se señalan algunos de los biomarcadores empleados en la presente Tesis Doctoral (Adaptado de Hampel *et al.* 2016; Kroon *et al.* 2017).

### 1.7 Selección de la especie *Solea senegalensis*

*Solea senegalensis* (Fig. 1.3), o lenguado senegalés, (Kaup, 1858) es un teleósteo marino que habita áreas costeras y estuarinas, sometido a grandes cambios de temperatura y salinidad (Imstrand *et al.* 2003). Es una especie marina bentónica, que habita en fondos arenosos y se camufla en ellos, llegando a una profundidad de hasta 100 metros. Se alimenta de organismos invertebrados bentónicos, como anélidos, larvas de poliquetos y moluscos bivalvos, principalmente por la noche. Como especie bentónica costera, *S. senegalensis* está expuesto a una gran variedad de sustancias químicas, procedentes de los vertidos de aguas residuales, que alcanzan el mar y se diluyen en el agua, o que son retenidas en el sedimento y pueden entrar en su organismo a través de la alimentación.



Figura 1.3. *Solea senegalensis* (Fuente: [www.ictioterm.org](http://www.ictioterm.org))

El uso de teleósteos como especies centinela para evaluar los efectos fisiológicos y bioquímicos inducidos por la contaminación de los ecosistemas acuáticos ha aumentado en los últimos años, debido principalmente a su posición en la cadena trófica y a su interés comercial. En concreto, el género *Solea* incluye

especies que se han utilizado cada vez más en estudios de vigilancia de la contaminación en aguas marinas del sur de Europa (Gonçalves *et al.* 2014; Oliva *et al.* 2014; Siscar *et al.* 2015; Solé *et al.* 2013).

### **1.8 Hipótesis y Objetivos**

La preocupación general por la creciente introducción de sustancias farmacológicamente activas en medios acuáticos naturales y las graves consecuencias que el calentamiento global supone para los seres vivos, hace necesario estudiar los efectos que puedan provocar la actuación individual y conjunta de ambos factores.

La presente Tesis Doctoral tiene como punto de partida dos hipótesis generales que son: 1) La aclimatación a la temperatura comporta cambios fisiológicos y bioquímicos que afectan a los enzimas antioxidantes y de biotransformación en *S. senegalensis*. Y 2) El ibuprofeno y la carbamazepina producen alteraciones bioquímicas y fisiológicas en *S. senegalensis* que son influidas por la temperatura de aclimatación.

El objetivo general de la presente Tesis es estudiar el efecto de la temperatura de aclimatación sobre los enzimas antioxidantes y de biotransformación, y sobre diversos aspectos fisiológicos en juveniles de *S. senegalensis*, así como las respuestas a diferentes niveles de organización biológica (Fig. 1.4) tras la administración de IB y CBZ, considerando el papel modulador de la temperatura de aclimatación. Los estudios realizados y que conforman la base de esta Tesis han dado lugar al planteamiento de los siguientes objetivos particulares.

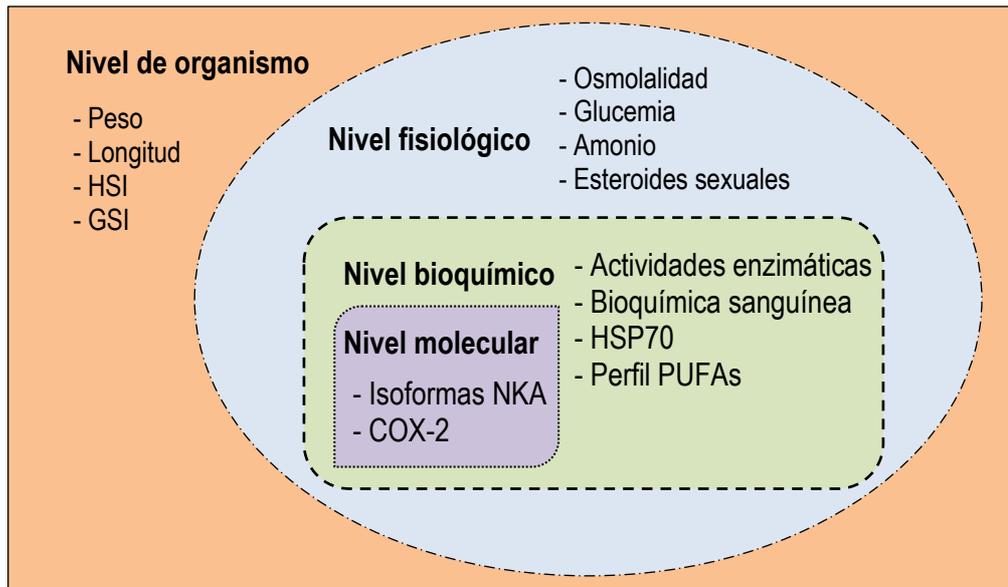


Figura 1.4. Niveles de organización biológica analizados y parámetros determinados en cada nivel.

1. Analizar la influencia de la temperatura de aclimatación a largo plazo sobre diferentes respuestas fisiológicas (biometría, GSI, osmorregulación y glucemia), y bioquímicas, relacionadas con los enzimas de biotransformación (EROD, CECOD, CbE, UDPGT y GST), de defensa antioxidante (CAT, LH, t-GPx, GR y LP), de actividad nerviosa (AChE), de protección frente al estrés (HSP70), y de otros procesos metabólicos (metabolitos en sangre) en juveniles de *S. senegalensis*.
2. Investigar las respuestas generadas tras administración de IB y CBZ, en combinación con la temperatura de aclimatación, sobre los diferentes aspectos fisiológicos y bioquímicos en juveniles de *S. senegalensis*.

3. Evaluar los efectos de la administración de IB y CBZ, en combinación con la temperatura de aclimatación, sobre el estatus osmorregulatorio, tanto a nivel enzimático (actividad NKA) como molecular (expresión de las isoformas  $\alpha 1a$  y  $\alpha 1b$  de NKA), el metabolismo de ácidos grasos (perfil PUFAs), la cascada del AA (expresión del gen COX-2), y sobre algunos parámetros reproductivos (niveles de secreción de hormonas sexuales) en juveniles de *S. Senegalensis*.

## **2. Material y Métodos**



## 2.1 Animales experimentales

Los estudios realizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo con ejemplares juveniles de la especie *Solea senegalensis*, suministrados por la empresa acuícola Stolt Sea Farm S.A. (La Coruña, España). Los ejemplares de aproximadamente 150-200 g de peso se transportaron a las instalaciones de la Planta de Acuarios-SCSIE de la Universitat de València, y durante dos meses fueron aclimatados a las condiciones de las instalaciones, a fin de evitar infecciones. El fotoperiodo fue de 12L:12O (luz:oscuridad) durante toda la experiencia. Los peces se alimentaron diariamente a saciedad (*ad libitum*) manualmente con pellets comerciales Le-5-Elite (Skretting, UK), excepto en los momentos de ayuno requeridos antes de cada toma de muestras (ver apartado 3.2 Diseño experimental).

## 2.2 Diseño experimental

### 2.2.1 Aclimatación a la temperatura

Para estudiar los efectos de la temperatura, 24 ejemplares de *S. senegalensis* del stock fueron distribuidos en tanques redondos de 3 m<sup>3</sup>, y se aclimataron a las temperaturas de 15 y de 20 °C. La temperatura de 15 °C se alcanzó disminuyendo la temperatura del agua a una velocidad paulatina de aproximadamente 1 °C al día, a partir de la temperatura ambiental de 20° C. No se contempló el uso de temperaturas más bajas (< 15 °C) dado que en otro estudio similar se vio que *S. senegalensis* dejaba de alimentarse al alcanzar los 12 °C (Arjona *et al.* 2010), y tampoco se experimentaron temperaturas más elevadas (> 20 °C) ya que aumentaba el riesgo de infección bacteriana en ambientes de confinamiento a largo plazo en peces (Nikoskelainen *et al.* 2004; Vazzana *et al.*

2002). Las condiciones físico-químicas del agua se controlaron diariamente (Tabla 2.1), durante toda la experiencia.

Tabla 2.1. Condiciones físico-químicas del agua durante el experimento.

	Grupo de 15° C	Grupo de 20 °C
Temperatura (°C)	15,8 ± 1,8	19,1 ± 0,6
Salinidad (psu)	29,0 ± 0,9	29,6 ± 1,2
O <sub>2</sub> disuelto (%)	98,3 ± 1,7	97,8 ± 1,3

psu: unidades prácticas de salinidad o g NaCl/l H<sub>2</sub>O

La toma de muestras se realizó al inicio del experimento de aclimatación (t0), a los 30 días (t30), y a los 60 días (t60). Para cada condición experimental se muestrearon 8 ejemplares al azar mantenidos en ayuno las 24 horas previas.

### 2.2.2 Exposición a los fármacos ibuprofeno y carbamazepina

De manera paralela, 52 ejemplares de *S. senegalensis* del mismo stock fueron aclimatados durante dos meses a 15 y 20 °C en las mismas condiciones que las descritas en el apartado anterior. Tras 24 horas de ayuno, se tomaron 26 ejemplares de cada una de las temperaturas de aclimatación y fueron asignados a los grupos experimentales indicados en la Tabla 2.2.

Los dos fármacos seleccionados, el ibuprofeno (IB; n° CAS 15687-27-1) y la carbamazepina (CBZ; n° CAS 298-46-4), fueron adquiridos en Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain), y se administraron mediante inyección intraperitoneal (IP), ruta seleccionada con el fin de alcanzar una concentración tisular eficaz en un tiempo de exposición corto. Las dosis inyectadas se

seleccionaron para que estuvieran en el mismo rango, o en un rango inferior, a la recomendada para el tratamiento por vía oral en humanos, 10 mg/kg de IB y 1 mg/kg de CBZ. El aceite de girasol (A.G.) se empleó como sustancia vehicular o disolvente de los fármacos, y constituye el verdadero control de los experimentos. El grupo experimental Control (C) estaba compuesto por individuos a los que no se les administró ninguna sustancia y fue utilizado para contrastar el efecto del propio disolvente. Los peces fueron mantenidos en condiciones de ayuno una vez administradas las inyecciones hasta el momento del sacrificio y la toma de muestras, que tuvo lugar transcurridas 48 horas.

Tabla 2.2. Diseño de los grupos experimentales y tamaño muestral de cada grupo (N).

Grupos Experimentales			
15 °C		20 °C	
Control	N = 8	Control	N = 8
Aceite de girasol	N = 6	Aceite de girasol	N = 6
Ibuprofeno	N = 6	Ibuprofeno	N = 6
Carbamazepina	N = 6	Carbamazepina	N = 6

### 2.3 Toma de muestras

En todos los estudios se siguieron las mismas pautas a la hora de tomar las muestras. Antes del sacrificio se recogieron los datos de longitud y peso total de cada ejemplar para calcular los parámetros biométricos. A continuación se tomaron las muestras de sangre mediante punción de la vena caudal con una jeringuilla heparinizada de 1 ml. La sangre se centrifugó a 3.000 g durante 5 min, y a 4°C, para separar el plasma que fue alicuotado y congelado a -20 °C hasta su análisis. Por último, los peces fueron anestesiados con benzocaína (100 mg/l) y sacrificados mediante sección de la médula espinal. Los tejidos seleccionados

para determinar los diferentes parámetros fueron hígado, branquias, intestino, riñones y músculo. Tras la disección fueron congelados instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su análisis. Previamente, el hígado y la gónada fueron pesados para determinar los índices biométricos correspondientes.

Tanto la manipulación y como el sacrificio de los peces se realizaron de acuerdo con las normas nacionales e institucionales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Directiva 2010/63/UE.

## **2.4 Determinación de las respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares**

La Tabla 2.3 recoge todos los parámetros determinados de manera específica en cada apartado de la presente Tesis con el fin de obtener una visión global de todas las respuestas analizadas.

Las actividades correspondientes a los enzimas de biotransformación y a los enzimas antioxidantes fueron proporcionados por la Dra. Solé (ICM-CSIC). El análisis de la información y su interpretación y discusión, en el contexto de los diseños experimentales descritos, forman parte de la presente Tesis Doctoral.

### *2.4.1 Obtención de las fracciones subcelulares*

El procesado de las muestras siempre se llevó a cabo en frío. El procedimiento general que se siguió para la obtención de las fracciones subcelulares se describe a continuación. En aquellos casos en los que se requirió alguna preparación más específica, ésta se detalla en el apartado de metodología correspondiente a su análisis.

Tabla 2.3. Descripción de los parámetros analizados en cada apartado de esta Tesis.

Parámetros Analizados		
<i>Modulación del metabolismo de xenobióticos por la temperatura</i>	Estado fisiológico	HSI, GSI, CF
	Biotransformación	Fase I: EROD, CECOD, CbE $\alpha$ NA Fase II: UDPGT, GST
	Estrés oxidativo	CAT, t-GPX, GR, LDH, LP
	Transmisión impulso nervioso	AChE
	Parámetros plasmáticos	Glucosa, lactato, triglicéridos
	Osmorregulación	Osmolalidad
	Parámetros de estrés	HSP70, PY
<i>Respuestas fisiológicas y bioquímicas frente al IB y la CBZ, moduladas por la temperatura</i>	Estado fisiológico	HSI
	Biotransformación	Fase I: EROD, MROD, CECOD, BFCOD, NAD(P)H Fase II: UDPGT, GST
	Estrés oxidativo	CAT, t-GPX, GR
	Parámetros plasmáticos	Glucosa, lactato, triglicéridos, creatinina, GOT, $\gamma$ -GT
	Osmorregulación y excreción N	Osmolalidad, amoniaco
<i>Efectos del IB y la CBZ sobre el estatus osmorregulatorio, el metabolismo de lípidos y parámetros reproductivos</i>	Parámetros de estrés	HSP70
	Osmorregulación	Actividad NKA, expresión isoformas $\alpha$ 1 NKA
	Cascada AA	Expresión COX-2
	Metabolismo de ácidos grasos	Perfil PUFAs
	Reproducción	VTG, E2, T, 11KT, 17,20 $\beta$ -P

Las muestras de hígado ( $\approx 1$  g) y de branquias ( $\approx 0,3$  g) fueron homogenizadas en 1,5 ml de tampón fosfato (100 mM, pH 7,4) que contenía KCl (150 mM), ditioneitol (DTT; 1 mM), fenantrolina (0.1 mM), 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 1 mM) usando un Polytron® blender. Los homogenizados obtenidos se centrifugaron a 10.000 g durante 30 min a 4 °C para separar la fracción subcelular S10 de ambos tejidos. Las fracciones citosólica y microsomal de las muestras de hígado se obtuvieron a partir de una segunda centrifugación del sobrenadante a 100.000 g, durante 60 min a 4 °C. El pellet microsomal resultante se resuspendió en el tampón de homogenización inicial con glicerol al 20% en una proporción 1:2 (p:v) (Koenig *et al.* 2013).

#### 2.4.2 Determinación de los enzimas de biotransformación

Todos las determinaciones de los enzimas relacionadas con la biotransformación de xenobióticos se realizaron con protocolos adaptados a microplaca de 96 pocillos. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de placas modelo Infinite M200 (TECAN, Suiza). El contenido de proteína total de las muestras se determinó mediante el método de Bradford (1976) empleando el kit Bradford Protein Assay (Bio-Rad) y suero de albumina bobina (BSA) como patrón, adaptado a microplaca. La absorbancia de las muestras se midió por triplicado a 595 nm. Todas las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo por triplicado.

#### 2.4.2.1 Enzimas implicados en la fase I de la biotransformación

La actividad catalítica correspondiente a los enzimas del citocromo P450 (CYP) fue determinada en las fracciones S10 y/o microsomal de las muestras de hígado, y en la fracción S10 de las branquias. Para ello se emplearon, en función de la actividad a determinar, cuatro sustratos; 7-etoxiresorufina (ER), 7-metoxiresorufina (MR), 3-ciano-7-etoxicumarina (CEC) y 7-benciloxi-4-trifluorometilcumarina (BFC) *O*-desetilasa, siguiendo el método descrito en Smith y Wilson (2010), con algunas modificaciones. En resumen, 10 µl de la fracción hepática microsomal, o 50 µl de la fracción S10 de las branquias, fueron incubados durante 10 min a 30 °C con una mezcla formada por NADPH (0,2 mM) y cada uno de los sustratos específicos en tampón fosfato (100 mM, pH 7,4), excepto para la determinación de CECOD, en la que se utilizó tampón Tris (100 mM, pH 7,4). La formación de los metabolitos correspondientes a cada actividad se determinó cinéticamente por fluorescencia a 537 nm EX (excitación)/583 nm EM (emisión) para las actividades EROD y MROD; 408 nm EX/455 nm EM para la actividad CECOD; y 410 nm EX/538 nm EM para la actividad BFCOD. La cuantificación se realizó con una curva de calibrado de seis puntos (0-160 nM) para cada metabolito específico. Las actividades relacionadas con los CYP se expresaron en picomoles de sustrato transformado por minuto y por miligramo de proteína.

Las actividades de los enzimas pertenecientes al sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P450, la NADPH-citocromo P450-reductasa y la NADH-citocromo b<sub>5</sub>-reductasa, fueron analizadas siguiendo el protocolo descrito en Solé y Livingstone (2005). Ambas actividades se midieron por el incremento de absorbancia a 550 nm, usando el coeficiente de extinción

molar ( $\epsilon$ ) de  $19,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Para determinar las actividades NADPH-cit *c* red y NADH-cit *b*<sub>5</sub> red se emplearon 50 y 10  $\mu\text{l}$  de microsomas hepáticos, respectivamente. Los resultados se expresaron como nanomoles de sustrato transformado por minuto y por miligramo de proteína.

La actividades carboxilesterasa (CbE) se determinó usando el sustrato acetato de  $\alpha$ -naftilo ( $\alpha\text{NA}$ ) en la fracción S10 del hígado y de las branquias, y en la fracción microsomal hepática. Se utilizaron 25  $\mu\text{l}$  de muestra y 200  $\mu\text{l}$  de  $\alpha\text{NA}$  (250  $\mu\text{M}$ ) para el análisis. La absorbancia de la reacción se midió durante 5 min a 235 nm, de acuerdo con lo descrito por Mastropaolo y Yourno (1981). La actividad se expresó como nanomoles de sustrato transformado por minuto y por miligramo de proteína.

#### 2.4.2.2 Enzimas implicados en la fase II de la biotransformación

El ensayo para determinar la actividad uridina difosfato glucuronosiltransferasa (UDPGT) se realizó en la fracción microsomal de las muestras de hígado, siguiendo el procedimiento descrito en Collier *et al.* (2000). Para ello se emplearon 10  $\mu\text{l}$  de microsomas y una mezcla que contenía 4-metil umbeliferona (MU; 0,1 nM), en un tampón fosfato de pH 7,4, con  $\text{MgCl}_2$  (5 nM) y un 0,05% de BSA, y ácido uridin difosfo-glucurónico (UDPGA; 2 mM). La reacción se midió cinéticamente por fluorescencia durante 10 min a 30 °C, a 355 nm EX/460 nm EM. La cuantificación de la actividad se realizó con una curva de calibrado de ocho puntos empleando MU como estándar (0-16  $\mu\text{M}$ ). Los resultados se expresaron en nanomoles por minuto y por miligramo de proteína.

La actividad glutatión-S-transferasa (GST) se determinó en la fracción S10 de las branquias y del hígado, o en la fracción citosólica hepática. La reacción final contenía 25  $\mu$ l de muestra y una mezcla formada por 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB; 1 mM) como sustrato, y glutatión reducido (GSH; 1 mM). La velocidad de la actividad se determinó siguiendo durante 5 min la variación de la absorbancia a 340 nm (Habig *et al.* 1974), y el resultado se expresó como nanomoles por minuto y por miligramo de proteína.

#### 2.4.3 Parámetros relacionados con el estrés oxidativo

Todas las determinaciones de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo se llevaron a cabo con protocolos adaptados a microplaca de 96 pocillos, y con un espectrofotómetro de placas modelo Infinite M200 (TECAN). La proteína total se determinó con el kit Bradford Protein Assay (Bio-Rad), empleando BSA como patrón, adaptado a microplaca. La absorbancia de las muestras se midió por triplicado a 595 nm. Todas las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo por triplicado.

##### 2.4.3.1 Enzimas antioxidantes

La actividad catalasa (CAT) se determinó en las fracciones S10 y citosólica del hígado, y en la fracción S10 de las branquias. Las actividades glutatión peroxidasa total (t-GPX) y glutatión reductasa (GR) se midieron únicamente en el hígado, en las fracciones S10 y citosólica. Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología descrita en Koenig y Solé (2012). En resumen, la CAT se cuantificó mediante la disminución de absorbancia a 240 nm utilizando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ; 50 mM) como sustrato. La actividad CAT se expresó en micromoles de  $H_2O_2$  descompuesto por minuto y por

miligramo de proteína. Las actividades t-GPX y GR se cuantificaron midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm, utilizando hidroperóxido de cumeno (CHP; 0,625 mM) como sustrato para la actividad t-GPX, y glutatión oxidado (GSSG; 0,9 mM) como sustrato para la actividad GR; y se expresaron como nanomoles de sustrato transformado por minuto y por miligramo de proteína.

La actividad lactato deshidrogenasa (LDH) se determinó en la fracción subcelular S10 del hígado, de acuerdo con el método desarrollado por Vassault (1983), y adaptado a microplaca. Se utilizaron 25 µl de muestra, 150 µl de NADH (300 µM) y 50 µl de piruvato (4,5 mM). La actividad se cuantificó midiendo la disminución de la absorbancia durante 3 min a 340 nm. La actividad se expresó como nanomoles por minuto y por miligramo de proteína.

#### 2.4.3.2 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica (LP) se determinó en la fracción S10 del músculo. Se incubaron 200 µl de muestra con una mezcla que contenía 650 µl de 1-metil-2-fenilindol diluido en metanol:acetonitrilo (1:3) y 150 µl de HCl al 37%, durante 40 min a 45 °C. Tras detener la reacción con un baño de hielo, la muestra se centrifugó durante 10 min a 13.000 g con el fin de precipitar las proteínas. El contenido de malondialdehído (MDA) se determinó a partir de la absorbancia medida a 586 nm, utilizando el 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TEP) como patrón. La LP se expresó como nanomoles de MDA por gramo de peso húmedo de tejido. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

#### 2.4.4 Parámetros relacionados con el impulso nervioso

La actividad acetilcolinesterasa (AChE) se midió en la fracción S10 del músculo y de las branquias. Para determinar la actividad AChE se mezclaron 25  $\mu$ l de muestra con 150  $\mu$ l de 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB; 270  $\mu$ M) y, tras 2 min de incubación, se inició la reacción añadiendo 50  $\mu$ l de sustrato acetilcolina (ASCh; concentración final de 1 mM). La actividad se determinó midiendo la absorbancia durante 5 min a 405 nm en un espectrofotométrico de placas modelo Infinite M200 (TECAN), siguiendo el protocolo descrito en Ellman *et al.* (1961) adaptado a microplaca (Solé *et al.* 2010). La proteína total se determinó con el kit Bradford Protein Assay de Bio-Rad, con BSA como patrón y midiendo la absorbancia a 595 nm. La actividad se expresó en nanomoles de producto transformado por minuto y por miligramo de proteína. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

#### 2.4.5 Parámetros plasmáticos

Todas las determinaciones de parámetros plasmáticos se llevaron a cabo por triplicado, mediante kits colorimétricos comerciales adaptados a microplaca de 96 pocillos y empleando 2,5  $\mu$ l de muestras sin diluir.

Para la determinación de la glucosa plasmática se utilizó el kit comercial de SPINREACT «*Determinación cuantitativa de glucosa GOD-POD Líquido*» (Ref: 41011); y para el lactato, el kit comercial de SPINREACT «*Determinación cuantitativa de lactato LO-POD Enzimático colorimétrico*» (Ref: 1001330). Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de placas modelo SpectraFLUOR (TECAN), a una longitud de onda de 550 nm. Los valores de glucosa y lactato plasmáticos se expresaron como milimoles por litro.

La determinación de los triglicéridos plasmáticos se realizó con el kit comercial de SPINREACT «*Determinación cuantitativa de triglicéridos GPO-PO Enzimático colorimétrico*» (Ref: 1001312). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas modelo Victor 2V (Perkin-Elmer, EEUU). Los valores de triglicéridos plasmáticos se expresaron como milimoles por litro.

Para medir la creatinina en el plasma se siguió la metodología descrita en el kit de LINEAR Chemicals S.L. «*Creatinina. Método cinético colorimétrico, Tiempo Fijo*» (Ref: 1123005). Tanto el ácido pícrico (25 mmol/l), como el tampón fosfato (300 mmol/l; pH 12,7), fueron preparados en fresco siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante. Como patrón de calibración se empleó una solución de creatinina a una concentración de 2 mg/dl. La absorbancia se determinó a 490 nm en un lector de placas Victor 2V (Perkin-Elmer), y los datos se expresaron como micromoles por litro.

Los valores de las actividades transaminasas en sangre se determinaron con los kits de SPINREACT «*Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa GOT (AST) NADH Cinético UV IFCC rec Líquido*» (Ref: 41272), y «*Determinación cuantitativa de gamma-glutamyl transferasa ( $\gamma$ -GT) Substrato carboxilado Cinético Líquido*» (Ref: 41292). Las absorbancias de las muestras se midieron en microplacas aptas para longitudes de onda correspondientes al espectro ultravioleta (UV), a una longitud de onda de 340 nm para GOT (SpectraFLUOR, TECAN), y de 405 nm para  $\gamma$ -GT (Victor 2V, Perkin-Elmer). Las actividades se expresaron como unidades (U) por litro (1U = 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto).

## 2.4.6 Parámetros relacionados con la osmorregulación

### 2.4.6.1 Plasmáticos

Los valores de osmolalidad fueron determinados en el plasma empleando un osmómetro modelo 210 Micro-Sample Osmometer (Fiske®). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, usando 20 µl de plasma sin diluir. El osmómetro se calibró mediante una solución estándar de 290 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Los valores de osmolalidad plasmática se expresaron en mOsm/kg de H<sub>2</sub>O.

Las concentraciones de amoníaco en plasma se cuantificaron con el kit comercial de SPINREACT «*Determinación cuantitativa de amoníaco. Enzimático-UV*» (Ref: 1001410). Las lecturas se llevaron a cabo en microplacas aptas para UV, a 340 nm, en un lector de placas SpectraFLUOR (TECAN). Los valores se expresaron en micromoles por litro.

### 2.4.6.1 Actividad Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa

Las actividades Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa (NKA) se determinaron en diferentes tejidos (branquias, riñón e intestino), usando el método descrito en McCormick (1993), con algunas modificaciones, y se calcularon como la diferencia en la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP), en presencia o ausencia de ouabaína. Las muestras de cada tejido (0,05-0,1 g de peso húmedo) se homogenizaron en 1,5 ml de una solución tampón que contenía sacarosa (150 mM), imidazol (50 mM) y sal de sodio del ácido etilendiaminotetraacético (Na<sub>2</sub>EDTA; 10 mM), todo ello ajustado a un pH final de 7,3. Cada muestra se homogeneizó usando un equipo Ultra-Turrax® (IKA, Alemania). Los homogeneizados se centrifugaron a 5.000 g durante 2 min a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C hasta los

análisis. El ensayo se basó en la incubación de las muestras en dos soluciones A y B que contenían el sustrato de la reacción, ATP, y las sales necesarias en un tampón. La solución B contenía además un inhibidor específico de la actividad NKA, la ouabaína. La concentración final en la solución A era: imidazol (0,1 M), MgCl $\cdot$ 6H $_2$ O (0,004 M), NaCl (0,1 M), KCl (0,02 M) y adenosín trifosfato disódico (ATP-Na $_2$ ; 0,003 M). La solución B se obtuvo añadiendo ouabaína a la solución A hasta una concentración final de 1 mM. La cantidad de ATP hidrolizado se determinó a partir del fósforo inorgánico (Pi) liberado durante la reacción mediante el método de Fiske y Subbarow (1925), utilizando una curva estándar de Pi. Para llevar a cabo el ensayo se depositó una alícuota de 5  $\mu$ l de cada muestra en un pocillo de la microplaca que contenía 100  $\mu$ l de solución A. Paralelamente se colocó otra alícuota de la misma muestra en otro pocillo que contenía 100  $\mu$ l de solución B. Después de 30 min de incubación a 37 °C, la reacción se detuvo en ambos pocillos con 100  $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, y a continuación se añadieron 100  $\mu$ l de solución AMS/Fiske. La absorbancia de la muestra se midió a 750 nm tras 30 min de incubación utilizando un lector de placas modelo SpectraFLUOR (TECAN). La proteína total se determinó con el kit Bradford DC-Protein Assay (Bio-Rad), empleando BSA como patrón, y se la absorbancia se midió a 595 nm. Las actividades de NKA de cada muestras se determinaron por triplicado y se expresaron como micromoles de ATP hidrolizado (Pi) por miligramo de proteína y por hora. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

#### 2.4.7 Parámetros relacionados con el estrés

Las proteínas de choque térmico (HSP70) se midieron en el músculo mediante la técnica de inmunoblot. Las muestras se homogeneizaron en tampón salino fisiológico libre de calcio-magnesio (1:10, p:v) que contenía: Hepes (20 mM), NaCl (500 mM), KCl (12,5 mM) ajustado a un pH de 7,3, y complementado en fresco con ditioneitol (DTT; 1 mM) , fluoruro de fenimetilsulfonio (PMSF; 1 mM), Igepal al 1% y un cóctel inhibidor de proteasa al 1% (Complete-Mini, libre de EDTA, ROCHE), usando un equipo Ultra-Turrax® (IKA). Las muestras se centrifugaron a 15.000 g durante 15 min a 4 ° C, y el sobrenadante se almacenó a -80 °C hasta el análisis. El contenido de proteína soluble total se determinó usando el kit Lowry Bio-Rad DC-Protein Assay, empleando BSA como estándar, y leyendo la absorbancia de las muestras a 750 nm. Cada muestra fue diluida convenientemente para que 20 µl de disolución contuvieran 21 µg de proteína total. Posteriormente las proteínas de las muestras se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE), durante 50 min a 200 V, usando el sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) a 1,3 A durante 40 min, empleando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo™ Blotting System (Bio-Rad). La inmunodetección se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón HSP70 (Sigma, H5147), y un anticuerpo secundario de anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa (Sigma, A4416). Las bandas de proteínas fueron visualizadas en un sistema de análisis de imagen VERSADOC (Bio-Rad), usando el sustrato de quimioluminiscencia ELC-Prime (Amersham), y se cuantificaron por densitometría usando el software Quantity One (Bio-Rad). La densidad de cada

banda se normalizó con la densidad de la banda del estándar comercial HSP70 (Sigma, H9776), en cada membrana, y al que se le dio el valor de 1. Los niveles de HSP70 se expresaron como unidades arbitrarias de HSP70 por nanogramo de proteína (Varó *et al.* 2007). Las determinaciones de HSP70 se llevaron a cabo por triplicado.

El rendimiento proteico (RP) de las muestras microsomales de hígado se expresó como el contenido de proteína total por gramo de tejido de peso húmedo.

#### 2.4.8 Análisis de lípidos

Los lípidos totales de las muestras de branquias se extrajeron siguiendo el método de Folch (Folch *et al.* 1957) con ligeras modificaciones. Las muestras de branquias liofilizadas (0,013-0,015 g) se homogeneizaron en tubos quickfit en 8 ml de cloroformo/metanol (2:1, v:v) con 0,01% de hidroxitolueno butilado (BHT), como antioxidante. A cada muestra se le añadieron 2 ml de KCl al 0,88%, y a continuación se centrifugaron a 2.000 rpm durante 2 min a 4°C. La fase acuosa se desechó y el resto se filtró y se lavó varias veces con cloroformo/metanol (2:1, v:v). La fase orgánica resultante se secó con un evaporador de nitrógeno analítico y para calcular el peso de los lípidos extraídos se usó una balanza analítica Mettler Toledo XS 105 (Barcelona, España). Las muestras así obtenidas se redisolvieron en concentraciones conocidas de cloroformo/metanol (2:1, v:v) con 0,01% de BHT, y se transfirieron a viales para almacenarse a -20 °C. Los lípidos totales contenidos en las muestras se sometieron a una transmetilación catalizada con ácido durante 16 horas a 50 °C, utilizando 1 ml de tolueno y 2 ml de ácido sulfúrico en metanol (Christie, 2003, Viciano *et al.* 2015).

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) se extrajeron en una solución de hexano:éter dietílico (1:1, v:v) que contenía BHT al 0,01%, y se purificaron mediante cromatografía en capa fina (gel de sílice G60, placas de vidrio de 20 x 20 cm, Merck, Darmstadt, Alemania) usando hexano:éter dietílico:ácido acético (85:15:1,5, v:v:v) como sistema disolvente. Los FAMES se analizaron a continuación mediante inyección en columna fría en un cromatógrafo de gases Thermo (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EE.UU.) equipado con una columna tubular abierta de sílice fundida de 30 m x 0,25 mm (Tracer, TR-WAX, 0,25 lm, Teknokroma, Barcelona, España), utilizando helio como soporte y un gradiente térmico de 50-220 °C durante el análisis de las muestras. Se empleó un sistema informático personal equipado con el software Azur Datalys versión 4.0.2.0 (St. Martin d'Herès, Francia) para registrar y procesar los datos del detector de ionización de llama. Los FAMES individuales se identificaron por comparación con estándares conocidos, un aceite de sardina bien caracterizado (Marinol; Instituto de Investigación de la Industria Pesquera, Rosebank, Sudáfrica) y una mezcla de referencia compuesta de 37 FAMES (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EEUU). La cantidad relativa de cada ácido graso se expresó como un porcentaje de la cantidad total de ácidos grasos de cada muestra.

#### *2.4.9 Parámetros relacionados con la reproducción*

Los niveles plasmáticos de vitelogenina (VTG) se midieron mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), optimizado para la especie *S. senegalensis* (Guzmán *et al.* 2008). Las muestras de plasma se analizaron con una dilución mínima de 10 veces, para evitar un efecto de matriz no específico en el ensayo. El límite de detección (DL) del ensayo fue de 14 ng/ml (x10 para

nuestras muestras de plasma). Las muestras con niveles indetectables se registraron considerando el límite de detección. El coeficiente de variación entre ensayos para el ELISA de VTG fue del 1,9%.

Los niveles plasmáticos de cuatro esteroides sexuales, estradiol (E<sub>2</sub>), testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-KT) y 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 $\beta$ -P), se analizaron mediante ELISAs específicos para cada esteroide, siguiendo los protocolos validados previamente para *S. senegalensis* (Guzmán *et al.* 2008). Las muestras de plasma se extrajeron primero con metanol y luego se analizaron diluidos al menos 10 veces para evitar el efecto de matriz no específica en el ensayo. El límite de detección de los ELISAs de E<sub>2</sub>, T, 11-KT y 17,20 $\beta$ -P fueron de 0,086, 0,035, 0,001 y 0,107 ng/ml, respectivamente (10x para nuestras muestras de plasma). Los coeficientes de variación entre los ensayos de E<sub>2</sub>, T, 11-KT y 17,20 $\beta$ -P fueron de 5,2, 2,7, 3,7 y 2,3%, respectivamente. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

#### 2.4.10 Técnicas moleculares

##### 2.4.10.1 Extracción del ARN y síntesis del ADNc

El ARN total en las muestras de branquias se extrajo con el kit Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit (Promega Biotech Ibérica, S.L., Alcobendas, España) y se trató con DNasa I, de acuerdo con el protocolo del fabricante. La pureza de ARN se evaluó espectrofotométricamente empleando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EEUU). La síntesis de ADNc (ADN complementario) se llevó a cabo a partir de 2  $\mu$ g del ARN total extraído usando cebadores random y oligo\_dT (3:1, v:v) y con un Sistema de Transcripción Inversa GoScript, en un volumen total de 25  $\mu$ l, a 37 °C durante 1 hora (Promega,

Madison, WI, EEUU). Las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

#### 2.4.10.2 Clonación molecular y preparación de las curvas estándar

Se diseñaron cebadores específicos para cada gen con el objetivo de amplificar fragmentos de ADNc para la subunidad  $\alpha 1a$  de NKA (NKA  $\alpha 1a$ ), la subunidad  $\alpha 1b$  de NKA (NKA  $\alpha 1b$ ) y el gen 18s ribosomal (18s; empleado como gen constitutivo), utilizando el programa PrimerPlus3, y mediante las secuencias citadas en GenBank (*forward and reverse*; Tabla 2.4).

Con el fin de amplificar el primer fragmento de ADNc de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), y puesto que no se encontró la secuencia en GenBank, se emplearon los cebadores descritos (*forward and reverse*) para dicho gen en la especie *S. senegalensis* en el estudio de Norambuena *et al.* (2012). Usando como molde un pool de ADNc de nuestras muestras de *S. senegalensis* y dichos cebadores se hizo una PCR (reacción en cadena de la polimerasa), con el objetivo de amplificar el fragmento de interés de la COX-2. Las condiciones de la PCR fueron: una primera etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, de hibridación a 58 °C durante 30 segundos, de extensión a 72 °C durante 45 segundos y, posteriormente, una etapa de extensión final a 72 °C durante 7 min con el termociclador GoTaq® Green Master Mix (Promega). El producto obtenido de la PCR fue clonado en un plasmido pGEM-T Easy Vector (Promega) y secuenciado en el Servicio de Secuenciación de ADN del SCSIE de la Universidad de Valencia (Burjassot, España), donde se caracterizó un fragmento de 572 de pb (pares de bases) para el gen COX-2 de *S. senegalensis*. Los

cebadores específicos para la COX-2 fueron diseñados sobre el fragmento de ADN obtenido en el Servicio de Secuenciación utilizando el programa informático PrimerPlus3 (Tabla 2.4).

Una vez obtenidos los cebadores específicos para cada uno de los genes, se iniciaron las amplificaciones mediante varias rondas de PCR como se indica a continuación. La primera ronda de PCR se llevó a cabo empleando como molde un pool de ADNc de muestras de las branquias (diluidas 5 veces), y utilizando el cebador específico de cada gen, con unas condiciones de PCR de un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguido de 32 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, de hibridación a 58 °C durante 30 segundos, de extensión a 72 °C durante 45 segundos, y con una extensión final a 72 °C durante 5 min con el termociclador GoTaq® Green Master Mix (Promega). Los fragmentos obtenidos de las PCR fueron separados empleando un gel de electroforesis de agarosa al 1%, y purificados con los kits Illustra GFX PCR DNA y Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Si bien se detectaron correctamente los fragmentos de ADN de la NKA  $\alpha$ 1a, la COX-2 y el 18s, el fragmento de ADN de la NKA  $\alpha$ 1b obtenido después de la purificación tuvo que emplearse como molde para hacer una segunda PCR anidada, con diferentes condiciones (desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, de hibridación a 60 °C durante 30 segundos, de extensión a 72 °C durante 35 segundos, y con una extensión final a 72 °C durante 5 min), para obtener una identificación positiva del fragmento.

Cada producto final de las PCR se ligó y se clonó en pGEM-T Easy Vector (Promega). Los plásmidos resultantes se purificaron (GenElute™

Plasmid Miniprep Kit, Sigma Aldrich Química), se linealizaron y cuantificaron espectrofotométricamente empleando un equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific); a continuación se diluyeron en serie para generar una curva estándar de número de copias conocidos ( $10^8$  a 1 número de copias).

#### 2.4.10.3 Expresión de los genes de estudio

El análisis de la expresión de los genes diana, las isoformas NKA  $\alpha 1$  ( $\alpha 1a$  y  $\alpha 1b$ ), la COX-2 y el 18s, en las branquias de *S. senegalensis* se llevó a cabo con el Sistema de Detección de PCR en tiempo real CFX96™ de Bio-Rad (Alcobendas, España). Las amplificaciones de PCR en tiempo real (RT-PCR) se realizaron por duplicado, en un volumen final de 20  $\mu$ l que contenía, ó 5  $\mu$ l de ADNc diluido (1/5000 para la isoforma NKA  $\alpha 1a$  y el gen 18s, 1/20 para la isoforma NKA  $\alpha 1b$  y COX-2) de cada muestra desconocida, ó 5  $\mu$ l de cada punto de la curva estándar ( $10^7$ - $10^1$  para NKA  $\alpha 1a$ ;  $10^6$ - $10^0$  para NKA  $\alpha 1b$  y COX-2;  $10^8$ - $10^2$  para 18s). A continuación se les añadió 10  $\mu$ l de agua bi-destilada (ddH<sub>2</sub>O) estéril, 0,5  $\mu$ l de los cebadores específicos de cada gen (Tabla 2.4) y 4  $\mu$ l de la mezcla 5x PyroTaq EvaGreen® (Cultek Molecular Bioline, Madrid, España). Las amplificaciones de los fragmentos se llevaron a cabo siempre con un control negativo regular (sin molde control) que no contenía ADNc. Las condiciones de las RT-PCR incluyeron un primer paso de activación inicial a 95 °C durante 15 min, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, más 20 segundos a la temperatura de hibridación específica de cada par de cebadores (Tabla 2.4), y otros 20 segundos a 72 °C. Con el fin de confirmar la amplificación de un solo producto en cada reacción, se realizó una curva de disociación a incrementos de 0,5 °C, desde los 60 °C hasta alcanzar los 90 °C, después de cada fase de amplificación. El número de copias absoluto del gen diana en cada muestra se

calculó a partir de la curva estándar específica para cada gen. La expresión del gen de referencia 18s se utilizó para normalizar la cuantificación de las muestras desconocidas. No hubo formación de dímeros en los cebadores, y los controles negativos no se amplificaron.

Tabla 2.4. Pares de cebadores empleados en la preparación de los estándares (STD), y en el análisis de la expresión mediante RT-PCR, de las isoformas de la subunidad  $\alpha 1$  de la NKA, y de los genes COX-2 y 18s ribosomal (gen de referencia).

	Gen	Cebador	Secuencia del cebador	Tm (°C)	Nº de acceso <sup>1</sup>
<i>STD-PCR</i>	<i>ATP <math>\alpha 1a</math></i>	SSqatpaF1	5'-TGAATTGCAACCATGGGACT-3'		AB759891.1
		SSqatpaR2	5'- AATTCGGGCCATCTCTCTC-3'		
	<i>ATP <math>\alpha 1b</math></i>	SSqatpbF1	5'-AAGATCCTGATCTTCGGACTGT-3'		AB759892.1
		SSqatpbR2	5'-TCATCAGCACATTCCATCTCA-3'		
	COX-2	SSqCox2F1	5'-GTGCTGACATCTCGATCCCAC-3'		
		SSqCox2R1	5'-AGCCAGATGGTGCGTACATC-3'		
	18s	SSq18sF1	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'		EF126042.1
		SSq18sR1	5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'		
<i>RT-PCR</i>	<i>ATP <math>\alpha 1a</math></i>	SSqatpaF1	5'-TGAATTGCAACCATGGGACT-3'	55	AB759891.1
		SSqatpaR1	5'-GCTCTGGTGGATGAAAGACC-3'		
	<i>ATP <math>\alpha 1b</math></i>	SSqatpbF2	5'-CTTCGCATCTTCTCCTCGTC-3'	55	AB759892.1
		SSqatpbR2	5'-TCATCAGCACATTCCATCTCA-3'		
	COX-2	SSqCox2F2	5'-CGACCTGGAGAGGCAACACA -3'	57	
		SSqCox2R2	5'-TCGGGGACATGAGGAGGGTA -3'		
	18s	SSq18sF3	5'-CCCCTCGATGCTCTTAGCTG-3'	60	EF126042.1
		SSq18sR3	5'-CATGGCCCCAGTTCAGAGAG-3'		

Tm: Temperatura de hibridación específica de cada cebador.

<sup>1</sup> GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

#### 2.4.11 Análisis estadístico de los datos

Los datos se analizaron para comprobar que cumplieran las asunciones de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software estadístico SPSS Systems (SPSS Inc., v15.0). El nivel de significación se estableció para todas las pruebas estadísticas en  $p < 0,05$ .

##### 2.4.11.1 Modulación del metabolismo de xenobióticos por la temperatura

Los conjuntos de datos que no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad fueron transformados logarítmicamente ( $\log_{10}(x)$ ). Se empleó la prueba estadística F de ANOVA (Análisis de la varianza) de dos vías para analizar las diferencias entre los factores temperatura de aclimatación (15 y 20 °C) y tiempo (0, 30 y 60 días), seguida de una prueba *post hoc* Student-Newman-Keuls (SNK) para las comparaciones múltiples. La prueba t de Student se utilizó para contrastar las diferencias entre los dos grupos de temperatura (15 y 20 °C). Los parámetros plasmáticos, excepto los triglicéridos, se analizaron con un ANOVA de dos vías aplicando la aproximación de Welch, puesto que los datos siguieron sin cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad tras la transformación logarítmica. El test *post hoc* Games-Howel se empleó para las comparaciones múltiples, en caso de heterocedasticidad de varianzas. La correlación de Pearson (r) se utilizó para identificar parejas de asociaciones entre los parámetros analizados (n = 48).

#### 2.4.11.2 Respuestas fisiológicas y bioquímicas frente al ibuprofeno y la carbamazepina moduladas por la temperatura

Se empleó un análisis estadístico ANOVA de dos vías para explorar las diferencias entre grupos, para los factores tratamiento (administración de fármacos) y temperatura (15 y 20 °C), y su interacción, cuando la variable cumplía con los requisitos del análisis (normalidad y homogeneidad de varianzas). En los casos en los que la temperatura no tuvo un efecto sobre la variable analizada, se utilizó un ANOVA de una vía, seguido de una prueba *post hoc* SNK (para varianzas homogéneas) o Games-Howell (para varianzas heterogéneas), para analizar las diferencias entre los tratamientos (C, A.G., IB y CBZ). La prueba t de Student se utilizó para contrastar los dos grupos de temperatura (15 y 20 °C).

Las variables que no cumplieron con la homogeneidad de varianzas tras la transformación logarítmica se analizaron mediante pruebas estadísticas no paramétricas. La prueba de Kolmogorov-Smirnov (k = 2 muestras independientes) se utilizó para analizar el efecto de la temperatura, y la prueba de Kruskal-Wallis (k > 2 muestras independientes) para analizar las diferencias entre los tratamientos.

#### 2.4.11.3 Efectos del ibuprofeno y la carbamazepina sobre el estatus osmorregulatorio, el metabolismo de lípidos y parámetros reproductivos

El análisis estadístico ANOVA de dos vías se utilizó para explorar las diferencias entre grupos para los factores tratamiento y temperatura, y su interacción, cuando la variable cumplía con los requisitos del análisis, seguido de un análisis *post hoc* SNK para las comparaciones múltiples entre los tratamientos, y una prueba t de Student para contrastar los dos grupos de temperatura. Cuando

las variables no cumplieron la hipótesis de homogeneidad de varianzas se aplicó la corrección de Brown-Forsythe en el análisis ANOVA, seguido de la prueba *post hoc* Games-Howell para comparar los efectos del tratamiento para varianzas heterogéneas. Cuando la temperatura no tuvo ningún efecto se utilizó la prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post hoc* SNK para comparar los efectos de los tratamientos.

Los perfiles de ácidos grasos de las branquias fueron transformados (arcoseno) e integrados quimiométricamente en un modelo de análisis de componentes principales (ACP) para su análisis. El gráfico de puntuación obtenido tras la generación de los dos componentes principales se utilizó para tratar de identificar patrones de distribución de los ácidos grasos, entre las temperaturas de aclimatación y los tratamientos farmacéuticos.



### 3. Resultados y Discusión



### 3.1 Modulación del metabolismo de xenobióticos por la temperatura

Los resultados obtenidos en este apartado han sido publicados en: «*Xenobiotic metabolism modulation after long-term temperature acclimation in juveniles of Solea senegalensis*». Solé, M., Varó, I., González-Mira, A., y Torreblanca, A. (2015). *Marine Biology*, 162, 401-412. doi:10.1007/s00227-014-2588-2

#### 3.1.1 Parámetros biométricos y condición fisiológica

Como puede observarse en la Tabla 3.1, durante la experiencia los peces ganaron tanto en longitud como en peso a una velocidad similar, bajo ambos regímenes de temperatura. El factor de condición (CF) se mantuvo constante durante los dos meses que duró el experimento, pero el índice hepatosomático (HSI), determinado como  $(\text{peso hígado}/\text{peso total}) \times 100$ , disminuyó de forma gradual y significativa en el grupo de peces mantenido a 20 °C, mientras que aumentó transitoriamente a mitad de la experiencia en el grupo aclimatado a 15 °C. El índice gonadosomático (GSI, determinado como  $(\text{peso gónada}/\text{peso total}) \times 100$ ) fue diferente entre machos y hembras, tal como se esperaba, pero no pudo correlacionarse con la temperatura de aclimatación. Las tasas de crecimiento similares observadas para las dos temperaturas de aclimatación durante todo el experimento, al igual que la estabilidad del CF, sugieren que los peces estaban en buenas condiciones fisiológicas.

Tabla 3.1. Medias  $\pm$  SD de los parámetros biológicos y biométricos de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), durante 60 días. Diferentes letras indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre grupos tras el análisis ANOVA de una vía y el *post hoc* SNK para cada parámetro (tiempo y temperatura de aclimatación).

Tiempo (días)	t0		t30		t60	
	T15	T20	T15	T20	T15	T20
Temperatura (°C)						
N(M:H)	8 (6:2)	8 (3:5)	8 (5:3)	8 (5:3)	8 (4:4)	8 (5:3)
Longitud total (cm)	23,6 $\pm$ 0,5a	23,8 $\pm$ 0,8ab	24,7 $\pm$ 0,3bc	24,6 $\pm$ 0,3bc	25,8 $\pm$ 0,6cd	26,6 $\pm$ 0,4d
Peso total (g)	198,3 $\pm$ 10,2a	216,4 $\pm$ 11,1ab	241,5 $\pm$ 7,0abc	237,9 $\pm$ 9,3abc	268,8 $\pm$ 15,9bc	288,4 $\pm$ 12,1c
CF	1,50 $\pm$ 0,05	1,63 $\pm$ 0,18	1,61 $\pm$ 0,06	1,60 $\pm$ 0,04	1,58 $\pm$ 0,08	1,55 $\pm$ 0,08
HSI	0,99 $\pm$ 0,05b	0,91 $\pm$ 0,06b	1,17 $\pm$ 0,05c	0,83 $\pm$ 0,06a	1,01 $\pm$ 0,06b	0,70 $\pm$ 0,04a
GSI (M)	n.d.	n.d.	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
GSI (H)	n.d.	n.d.	1,08 $\pm$ 0,24	1,07 $\pm$ 0,62	1,09 $\pm$ 0,55	1,02 $\pm$ 0,59
RP microsomas	27,7 $\pm$ 2,5	30,3 $\pm$ 2,6	39,5 $\pm$ 2,5	29,2 $\pm$ 5,4	37,5 $\pm$ 3,5	30,2 $\pm$ 4,7

Los valores alcanzados por los metabolitos plasmáticos en los diferentes grupos experimentales se muestran en la Figura 3.1. Estos marcadores variaron en su mayoría en función del tiempo de aclimatación (Tabla 3.2). El análisis de correlaciones (Tabla 3.3) mostró que la glucosa y el lactato evolucionaron de forma similar en ambos regímenes de temperatura ( $r = 0,458$ ;  $p = 0,001$ ), disminuyendo a los 30 días y alcanzando una condición estable al final del experimento, mientras que los triglicéridos aumentaron en el período intermedio ( $p < 0,05$ ). La estabilidad alcanzada por los niveles de glucosa y lactato tras 30 días de aclimatación no fue observada en los valores de osmolalidad, ya que continuó disminuyendo ligeramente hasta el día 60, de forma significativa (Fig. 3.1;  $p < 0,05$ ).

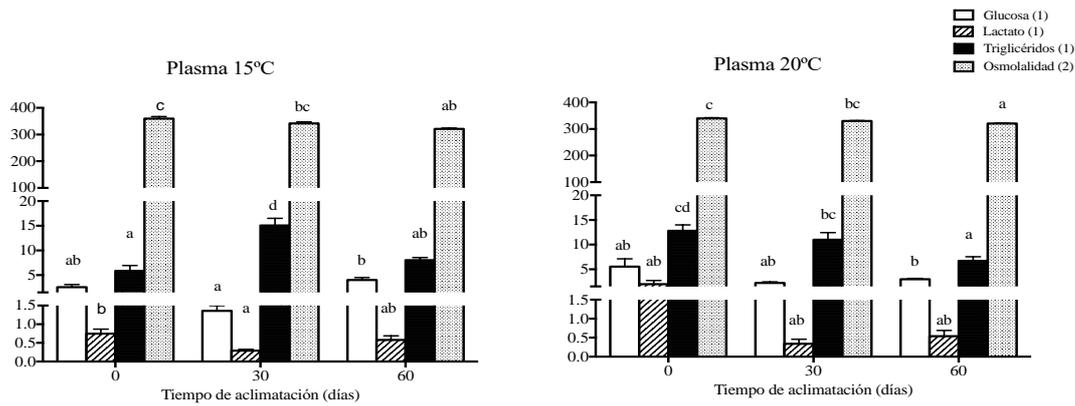


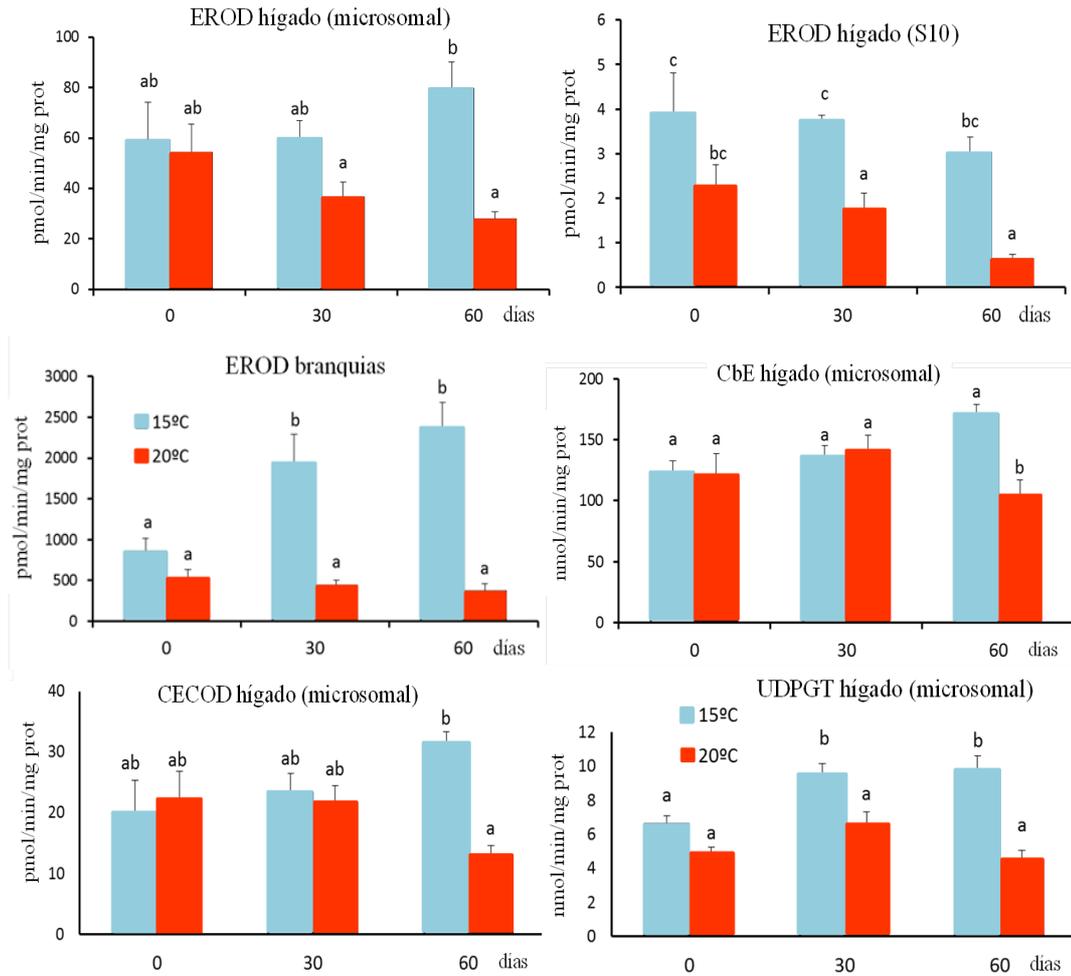
Figura 3.1. Medias  $\pm$  SEM de los valores plasmáticos de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), durante 60 días. Diferentes letras indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre grupos (ANOVA de una vía y *post hoc* Games-Howell). Junto a la leyenda de cada parámetro se indican las unidades entre paréntesis: (1) mmol/l, (2) mOsm/kg H<sub>2</sub>O.

Es importante tener en cuenta dos factores que son muy significativos a la hora de analizar dichos resultados. En primer lugar, la influencia natural que en los peces ejercen los factores hormonales, tanto en el proceso implicado en la osmorregulación, como durante el crecimiento y la maduración sexual (McCormick 2001). En segundo, el estrés por confinamiento que se produce en los peces. La estabilidad alcanzada por los parámetros plasmáticos (osmolalidad, glucosa, lactato) y los datos biométricos sugieren un buen proceso de adaptación fisiológica por parte de *S. senegalensis* a las dos temperaturas de aclimatación. Además, cabe destacar que los niveles plasmáticos analizados (glucosa, lactato y triglicéridos), así como los valores de HSI, están dentro de los encontrados en otras experiencias similares en las que se estudió el efecto de la temperatura de aclimatación en juveniles de *S. senegalensis* (Arjona *et al.* 2010; Costas *et al.* 2012).

### 3.1.2 Respuestas hepáticas, musculares y branquiales

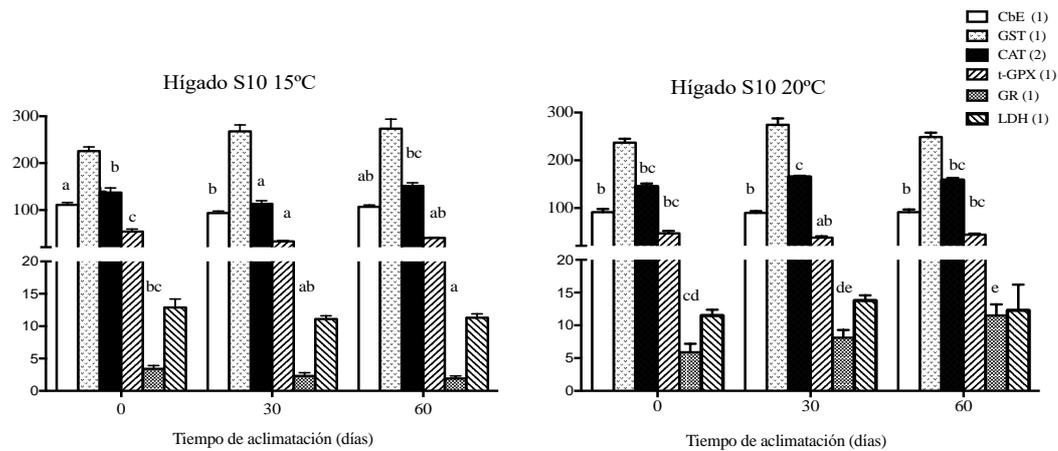
Tal como queda reflejado tras los análisis estadísticos (Tabla 3.2), la actividad hepática LDH, al igual que los niveles de HSP70 determinados en músculo, no se vieron afectados ni por la temperatura de aclimatación, ni por el tiempo de exposición a dichas temperaturas, permaneciendo constantes durante todo el experimento. Estos resultados también apoyan que *S. senegalensis* estaba bien adaptado a las temperaturas experimentales, puesto que están dentro del rango de variabilidad estacional en el Mediterráneo, donde oscilan entre 15 y 20 °C (Salat y Pascual 2002). Trabajos anteriores encontraron que la temperatura límite capaz de inducir la expresión de HSP70 en los teleósteos dependía directamente de la temperatura de aclimatación (Feidantsis *et al.* 2009, 2013). En estudios de laboratorio determinaron que la expresión de HSP70 en la dorada (*Sparus aurata*) se inducía al alcanzar una temperatura de aclimatación por debajo de los 13 °C (Kyprianou *et al.* 2010) o por encima de los 22-24 °C (Feidantsis *et al.* 2009). La falta de respuesta a la temperatura de aclimatación en los niveles de HSP70 encontrada en el presente estudio podría deberse a que dicha respuesta ya se habría producido de forma transitoria durante el tiempo transcurrido hasta alcanzar las temperaturas seleccionadas en este estudio, es decir, durante el tiempo de aclimatación antes del inicio del experimento ( $t_0$ ). Si bien la síntesis de HSP en animales responde preferentemente a desafíos de temperatura a corto plazo (Pörtner 2002), también se han encontrado variaciones en los niveles de HSP después de exposiciones a largo plazo en doradas aplicando mayores gradientes de temperatura (Feidantsis *et al.* 2009).

Los niveles de actividad EROD determinados en las diferentes fracciones subcelulares del hígado (S10 y microsomal) y en la fracción S10 de las branquias, así como las actividades UDPGT, CECOD y CbE determinadas en la fracción microsomal del hígado se muestran en la Figura 3.2. Las restantes actividades enzimáticas determinadas en la fracción S10 del hígado (CbE, GST, CAT, t-GPX, GR y LDH) se presentan en la Figura 3.3. Los resultados de todos los análisis estadísticos de las diferentes actividades se muestran en la Tabla 3.2. Las actividades EROD y CbE determinadas en la fracción S10 del hígado se vieron afectados significativamente por la temperatura, de modo que la aclimatación a la temperatura más baja (15 °C) se tradujo en un aumento de ambas actividades enzimáticas (Tabla 3.2;  $p < 0,01$ ).



**Figura 3.2.** Medias  $\pm$  SEM de los valores de las actividades EROD, CbE, CECOD y UDPGT determinadas en las fracciones microsomal y S10 del hígado, y en la fracción S10 de las branquias, de los ejemplares aclimatados a dos temperaturas (15 y 20 °C) durante 60 días. Diferentes letras indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre grupos (ANOVA de una vía y *post hoc* SNK).

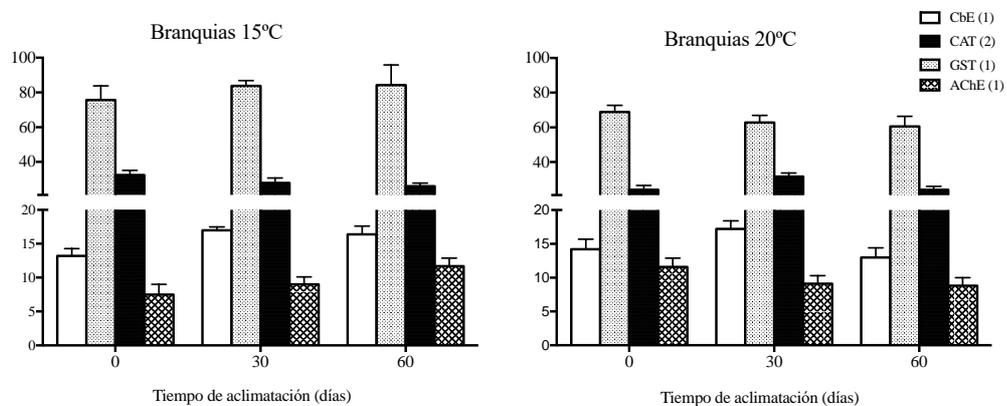
Las actividades hepáticas de los enzimas antioxidantes CAT y GR en el hígado (Fig. 3.3) también se vieron influidas por la temperatura, aunque de forma opuesta a la descrita para la EROD, dándose mayores actividades en los peces aclimatados a la temperatura más alta (Tabla 3.2;  $p < 0,001$ ). El tiempo de aclimatación también tuvo un efecto sobre las actividades enzimáticas analizadas en la fracción S10 del hígado. Las actividades GST y CAT aumentaron con el transcurso del experimento, mientras que las actividades EROD y t-GPX disminuyeron con el tiempo (Tabla 3.2;  $p < 0,05$ )



**Figura 3.3.** Media  $\pm$  SEM de los valores de las actividades de los enzimas determinados en la fracción S10 del hígado de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), durante 60 días. Diferentes letras indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre grupos (ANOVA de una vía y *post hoc* SNK). Junto a la leyenda de cada parámetro se indican las unidades entre paréntesis: (1) nmol/min/mg prot, (2)  $\mu$ mol/min/mg prot.

Las actividades EROD y CECOD determinadas en la fracción microsomal del hígado se vieron afectadas únicamente por la temperatura de aclimatación, mientras que la actividad UDPGT se vio alterada no solo por la temperatura, sino también por el tiempo de aclimatación (Tabla 3.2;  $p < 0,05$ ). La actividad hepática microsomal CbE varió en relación con la temperatura, pero sólo después de 60 días de aclimatación (Fig. 3.2).

Los parámetros enzimáticos determinados en las branquias se presentan en la Figura 3.4. Como puede observarse, las actividades EROD y GST se vieron afectadas únicamente por la temperatura de aclimatación, mientras que la actividad CAT solo varió con el tiempo (Tabla 2;  $p < 0,01$ ).



**Figura 3.4.** Medias  $\pm$  SEM de los valores de las actividades determinadas en la fracción S10 de las branquias de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), durante 60 días. Diferentes letras indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre grupos (ANOVA de una vía y *post hoc* SNK). Junto a la leyenda de cada parámetro se indican las unidades entre paréntesis: (1) nmol/min/mg prot, (2)  $\mu$ mol/min/mg prot.

La temperatura de aclimatación tuvo un claro efecto sobre las enzimas implicadas en la fase I del metabolismo de biotransformación. Esto fue más significativo en la actividad EROD analizada en las branquias y las dos fracciones subcelulares del hígado (S10 y microsomal), con diferencias de hasta cinco veces debidas a la temperatura tras 60 días de aclimatación. Una tendencia similar, aunque con diferencias más moderadas, se observó en las actividades CECOD y CbE en el hígado. Hasta donde sabemos, no hay datos comparables para estos parámetros en otros estudios similares de aclimatación realizados con *S. senegalensis* u otras especies de peces subtropicales.

Sin embargo, estudios previos en peces de aguas templadas también encontraron una mayor actividad EROD en el hígado de los ejemplares aclimatados a las temperaturas más bajas (Lange *et al.* 1998; Jorgensen y Wolkers 1999; Sleiderink *et al.* 1995), así como en la actividad EROD de las branquias (Abrahamson *et al.* 2008). Estos estudios refuerzan el concepto de la estrategia de compensación de la actividad enzimática que ocurre en peces durante el proceso de aclimatación a la temperatura, y que incluye también los enzimas de biotransformación de fase I (Fitzsimmons *et al.* 2007). El mecanismo principal propuesto para las respuestas de compensación mencionadas es un aumento en la síntesis de proteínas a temperaturas más bajas (Hill *et al.* 2006). Este efecto se puede constatar mediante la determinación *in vitro* y a una temperatura fija las actividades enzimáticas de ejemplares aclimatados a diferentes temperaturas. Recientes estudios de transcripción llevados a cabo en salmón Atlántico (*Salmo salar*), dan apoyo a una sobre-regulación en los genes que codifican para CYP1A como consecuencia de la disminución de la temperatura (Olsvik *et al.* 2013). De entre los resultados obtenidos en la presente Tesis destaca el incremento en cinco veces de la actividad EROD en las branquias de los ejemplares aclimatados a la

temperatura más baja. Tras los correspondientes cálculos, este incremento representaría una compensación térmica completa de la actividad con un valor aproximado de  $Q_{10} = 25$ , contrastando con el valor de  $Q_{10}$  de entre 2 y 3 descrito para la mayoría de actividades enzimáticas (Precht *et al.* 1973). No se puede descartar que, además de este mecanismo de compensación, existan también otros como los cambios en la fluidez de la membrana producidos por una temperatura baja (adaptación homeoviscosa), o en los cambios en los enzimas ligados a la membrana durante la aclimatación a la temperatura, como ocurre con la actividad EROD asociada al CYP1A en la trucha ártica *Salvelinus alpinus* (Jorgensen y Wolkers, 1999).

En la actualidad, se conoce el efecto de la temperatura sobre la actividad EROD en peces (Amutha y Subramanian, 2010; Andersson y Förlin, 1992; Lyons *et al.* 2011; Whyte *et al.* 2000); sin embargo, no se conocen en detalle las consecuencias que pueda tener la temperatura de aclimatación sobre otras enzimas de biotransformación de la fase I o de la fase II.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio llevado a cabo en peces que pretende discernir el efecto de la temperatura de aclimatación sobre las actividades CECOD y CbE. Es probable que en las especies del género *Solea* los sustratos ER y CEC, metabolizados por las isoformas CYP1A1 y CYP1A2, CYP2C9 y CYP2C19 respectivamente en los mamíferos, sean metabolizados por una única isoforma. Esta teoría se basa en el hecho de que la isoforma CYP1A2 parece estar ausente en estas especies de teleósteos (Koenig *et al.* 2013), y en que la familia CYP2 difiere mucho entre la de los peces y la de los mamíferos (Arellano-Aguilar *et al.* 2009). En cualquier caso, la magnitud del cambio provocado por la aclimatación a la temperatura cuando se usó CEC como sustrato del sistema P450 fue menor (Fig. 3.2). En esta ocasión, parece posible la

existencia de otras isoformas de CYP desconocidas, que también serían responsables del metabolismo de la actividad CECOD, pero menos influenciadas por la temperatura. Los resultados obtenidos para la actividad CbE analizada en la fracción S10 del hígado, empleando el  $\alpha$ NA como sustrato, han mostrado que la compensación enzimática por temperatura también afecta a la actividad de esta enzima (Fig. 3.2), puesto que al aumentar la temperatura, disminuyó la actividad (Tabla 3.2). Cabe destacar la importancia de la actividad CbE en relación con la protección frente a pesticidas en diferentes especies de peces (Wheelock *et al.* 2008), incluyendo *S. senegalensis* (Solé *et al.* 2012).

En relación con las enzimas de biotransformación de fase II, la actividad UDPGT microsomal también se vio afectada por la aclimatación a la temperatura, tal como indican los resultados estadísticos mostrados en la Tabla 3.2, duplicando su valor tras 60 días de exposición a la temperatura más baja (Fig. 3.2), hecho que daría cuenta de la ya mencionada compensación enzimática a la temperatura. La actividad GST mostró un patrón de respuesta dependiente del tejido, puesto que la actividad medida en branquias también mostró compensación a la temperatura (Fig. 3.4), mientras que la actividad analizada en el hígado no lo hizo (Fig. 3.3). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Carpenter *et al.* (1990), en los que tampoco se vio una alteración en la actividad GST en el hígado de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), criados a dos temperaturas (10 y 18 °C) durante 28 días, a pesar de que la actividad aril-hidrocarburo-hidroxilasa (AHH) analizada en los microsomas fue mayor a la temperatura de aclimatación más baja.

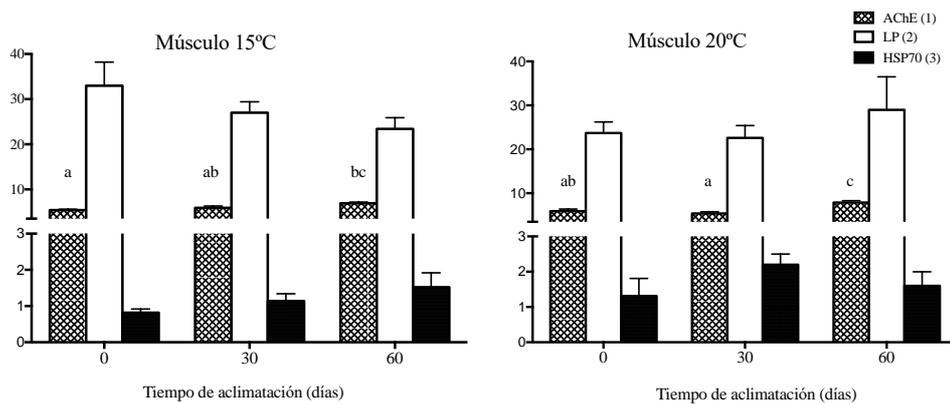
Al analizar los valores correspondientes a las actividades de las enzimas antioxidantes (GR y CAT) en el hígado (Fig. 3.3) se observa que también respondieron a la temperatura de aclimatación, aunque en este caso las actividades fueron mayores en los peces aclimatados a la temperatura más alta (Tabla 3.2). En

un estudio de campo con *S. senegalensis*, la actividad CAT también se correlacionó positivamente con la temperatura del agua (Fonseca *et al.* 2011a). Sin embargo, Castro *et al.* (2012) encontraron datos contradictorios respecto a las respuestas de las enzimas antioxidantes en ejemplares de *S. senegalensis* aclimatados a 12 y 18 °C, en un estudio de 2 meses en el que se consideró la dieta como otro factor experimental. En los estudios llevados a cabo en la presente Tesis doctoral se han controlado todos los factores, incluyendo el tiempo de aclimatación, la administración de alimento y los factores abióticos del agua, de forma que nos ha permitido analizar la influencia de la temperatura de una forma inequívoca.

Como puede observarse en la Figura 3.5, los niveles de LP en músculo no se vieron alterados como consecuencia del tiempo o de la temperatura de aclimatación (Tabla 3.2). La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) aumenta como consecuencia del aumento del metabolismo aeróbico en las especies ectotérmicas, cuando se ven sometidas a temperaturas ambientales altas (Lushchak y Bagnyukova, 2006). Aunque el régimen de temperatura seleccionado para este estudio está dentro del rango fisiológico óptimo de esta especie en las aguas atlánticas y mediterráneas de la Península Ibérica (Salat y Pascual, 2002; Vinagre *et al.* 2013), la respuesta observada en las enzimas antioxidantes fue indicativa de su importante papel en la prevención de la aparición de daño por estrés oxidativo. De hecho, esta protección antioxidante puede ser el motivo de la ausencia de cambios en los niveles musculares de LP, como consecuencia de la temperatura.

Las actividades determinadas en el músculo se muestran en la Figura 3.5. Como puede observarse, la actividad AChE aumentó durante el período de aclimatación, con independencia de la temperatura (Tabla 3.2). La influencia del

período de aclimatación a una temperatura sobre la actividad AChE es controvertida. Mientras que algunos estudios realizados en peces han observado un efecto positivo (Durieux *et al.* 2011), en otros, ha sido negativo (Botte *et al.* 2013), o sin efecto significativo (Beauvais *et al.* 2002). Cabe destacar la correlación positiva que se halló entre la actividad AChE y el tamaño de los peces ( $r = 0,459$ ;  $p = 0,001$ ). Este aumento de la actividad AChE al final de la experiencia de aclimatación, cuando los peces son más grandes, contradice la tendencia general previamente descrita por otros autores sobre la disminución de la actividad AChE con el aumento del tamaño de los ejemplares (Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008; Solé *et al.* 2006, 2010; Varó *et al.* 2003). Esta relación negativa entre el nivel de actividad AChE y la talla de los ejemplares también ha sido anteriormente descrito para *S. senegalensis* (Solé *et al.* 2012), aunque el rango de tamaños empleado en dicho estudio fue más amplio.



**Figura 3.6.** Media  $\pm$  SEM de los parámetros determinados en el músculo de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), durante 60 días. Diferentes letras indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre grupos (ANOVA de una vía y *post hoc* SNK). Junto a la leyenda de cada parámetro se indican las unidades entre paréntesis: (1) nmol/min/mg prot, (2) nmol de malondialdehído (MDA)/g de peso, (3) unidades arbitrarias/ng prot.

La magnitud de los cambios de las actividades enzimáticas implicadas en la biotransformación y en la defensa antioxidante después de una aclimatación a largo plazo a una diferencia de 5 °C de temperatura en *S. senegalensis* encontrada en la presente Tesis doctoral, puede dar cuenta, en parte, de la gran adaptabilidad de esta especie a fluctuaciones moderadas de temperatura. De hecho, la magnitud de las variaciones de estas actividades es, en general, superior a la descrita en estudios de campo, donde las fluctuaciones estacionales y la contaminación actúan simultáneamente (Fonseca *et al.* 2011a, b; Gonçalves *et al.* 2013; Oliva *et al.* 2010). Los resultados obtenidos en este estudio podrían contribuir a explicar el éxito en su expansión biogeográfica descrito para esta especie (Zenetos *et al.* 2012). Un estudio realizado en la sardina (*Sardinella aurita*), adaptada a temperaturas más cálidas en el Mediterráneo, demuestra que la expansión de esta especie a latitudes más septentrionales se debe al cambio climático (Sabatés *et al.* 2006). Desafortunadamente, no hay datos disponibles sobre la abundancia relativa de *S. senegalensis*, ni de otras especies simpátricas templadas en el Mediterráneo noroccidental. Este hecho dificulta la realización de algún estudio equivalente al llevado a cabo por Sabatés *et al.* (2006), utilizando el lenguado senegalés (*S. senegalensis*) como especie centinela, aunque es probable que se pueda producir un fenómeno similar al descrito para la sardina (*S. aurita*).

**Tabla 3.2.** Valores de la estadística del ANOVA (F) de dos vías para cada parámetro analizado en el estudio, seguidos de los valores obtenidos tras aplicar el análisis *post hoc* t de Student para la temperatura (T), y el análisis *post hoc* SNK para el tiempo (t).

Tejido	Parámetro	Temperatura (gl=1)	Tiempo (gl=2)	Temp * Tiempo (gl=2)
		F	F	F
Hígado S10	CbE	11,057** (T15>T20)	n.s	n.s
	EROD	27,976*** (T15>T20)	4,042* (t0>t30>t60)	n.s
	CAT	18,124*** (T15<T20)	3,530* (t0=t30<t60)	7,996**
	GST	n.s	5,483** (t0<t30=t60)	n.s
	t-GPX	n.s	10,199*** (t0>t60>t30)	n.s
	GR	66,411*** (T15<T20)	n.s	
	LDH	n.s	n.s	n.s
Hígado microsomas	CbE	n.s	n.s	4,150*
	EROD	11,077** (T15>T20)	n.s	n.s
	CECOD	6,755* (T15>T20)	n.s	4,741*
	UDPGT	26,773*** (T15>T20)	7,770** (t0=t60<t30)	4,445*
Branquias	AChE	n.s	n.s	n.s
	CbE	n.s	n.s	n.s
	EROD	59,399*** (T15>T20)	n.s	5,759**
	CAT	n.s	6,192** (t0=t30>t60)	4,130*
	GST	10,186** (T15>T20)	n.s	n.s
Músculo	AChE	n.s	14,570*** (t0=t30<t60)	n.s
	LP	n.s	n.s	n.s
Plasma	Glucosa	n.s	5,229* (t0>t30=t60)	3,760*
	Osmolalidad	5,274* (T15>T20)	13,462* (t0>t30>t60)	n.s
	Lactato	n.s	5,473* (t0>t30=t60)	n.s
	Triglicéridos	n.s	12,710* (t0=t60<t30)	12,656*

\*p < 0,5, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

n.s = diferencias no significativas; gl = grados de libertad.

### 3.1.3 Análisis de correlación entre los parámetros hepáticos y branquiales

En la Tabla 3.3 se muestran los coeficientes de correlación de Pearson entre los diferentes parámetros determinados en las dos fracciones hepáticas y en las branquias. Como puede observarse, hay una correlación positiva entre los valores de las actividades enzimáticas hepáticas determinados en las fracciones S10 (EROD) y microsomal (EROD, CECOD y CbE), con valores de  $r$  que varían desde 0,350 ( $p < 0,05$ ) hasta valores de 0,767 ( $p < 0,001$ ). Estos resultados tienen relevancia metodológica al sustentar que el uso de la fracción S10 proporciona una buena estimación de la actividad EROD en *S. senegalensis*, tal y como se sugiere en estudios previos (Sánchez-Nogué *et al.* 2013; Solé *et al.* 2012). También se encontró una correlación positiva entre los valores de EROD, de CECOD y de CbE, todos ellos analizados en la fracción microsomal del hígado (valores de  $r$  entre 0,547 y 0,826;  $p < 0,001$ ); así como entre los enzimas de fase I, de ambas fracciones hepáticas, y la actividad hepática de la enzima de fase II UDPGT (valores de  $r$  entre 0,392 y 0,505;  $p < 0,01$ ). Estos resultados eran de esperar ya que dichas actividades representan etapas consecutivas en los procesos de biotransformación en el hígado. En un estudio de campo llevado a cabo con *S. senegalensis*, también se observó una buena correlación entre las enzimas de fase I (EROD) y las de fase II (GST) (Fonseca *et al.* 2011a). Cabe destacar la correlación positiva observada en las enzimas determinadas en las branquias, tanto entre las de fase I, (EROD-CbE:  $r = 0,394$ ;  $p < 0,01$ ), como con las de fase II (EROD-GST:  $r = 0,568$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tabla 3.3.** Valores del coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los parámetros determinados en las diferentes fracciones del hígado (S10 y microsomal) y de las branquias (S10) de los ejemplares aclimatados a dos temperaturas (15 y 20 °C) durante 60 días (n = número de peces individuales por cada grupo experimental).

	Hígado S10										Hígado microsomal										Branquias S10											
	CbE	GST	CAT	GR	GPX	LDH	EROD	CbE	EROD	CECOD	UDPGT	ACHE	EROD	CAT	GST	CbE	GST	CAT	GR	GPX	LDH	EROD	CbE	EROD	CECOD	UDPGT	ACHE	EROD	CAT	GST	CbE	
<b>Hígado S10</b>	1	n.s	n.s	-0,362*	n.s	n.s	0,411**	0,404**	0,303*	n.s	0,359*	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
GST	1	1	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	0,294*	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
CAT	1	1	1	0,320*	n.s	n.s	-0,502***	n.s	-0,300*	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
GR	1	1	1	1	n.s	0,412**	-0,556***	-0,453**	-0,444**	-0,392**	-0,531***	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
GPX	1	1	1	1	1	0,577***	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
LDH	1	1	1	1	1	1	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
EROD	1	1	1	1	1	1	1	0,350*	0,767***	0,612***	0,505***	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
<b>Hígado microsomal</b>																																
CbE								1	0,547***	0,662***	0,505***	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
EROD								1	1	0,826***	0,392**	0,349*	0,470**	0,470**	0,417**	0,394**	0,470**	0,470**	0,392**	0,392**	0,392**	0,392**	0,392**	0,392**	0,392**	0,392**	0,392**	0,392**	0,392**	0,392**	0,392**	
CECOD										1	0,446**	0,290*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	0,341*	
UDPGT											1	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
<b>Branquias S10</b>																																
ACHe																																
EROD																																
CAT																																
GST																																
CbE																																

p < 0,05; \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

n.s no significativo para p > 0,05.

Por el contrario, la enzima antioxidante CAT se correlacionó negativamente con la actividad EROD, ambas medidas en la fracción hepática S10 ( $r = -0,502$ ;  $p < 0,001$ ); y también con las actividades de EROD y GST determinadas en las branquias ( $r = -0,428$ ;  $p < 0,01$  y  $r = -0,369$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente). Del mismo modo, la enzima antioxidante GR también se relacionó negativamente con la mayoría de las actividades enzimáticas de fase I y de fase II (valores de  $r$  entre  $-0,392$  y  $-0,556$ ;  $p < 0,05$ ). La respuesta inversa de las enzimas antioxidantes (CAT y GR) a la temperatura de aclimatación respecto a las respuestas de las enzimas de biotransformación, tanto en el hígado como en las branquias, sugiere posibles vías reguladoras independientes para estos dos grupos de enzimas, en las que las ROS y la hipoxia pueden tener un papel importante (Regoli y Giuliani, 2014). Además, la actividad hepática LDH, implicada en la oxidación del lactato en el hígado, se relacionó positivamente con las actividades antioxidantes hepáticas GR y GPX ( $r = 0,412$ ;  $p < 0,01$  y  $r = 0,577$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente). Estos resultados parecen sustentar la existencia de una relación entre la hipoxia y el estrés oxidativo (Regoli y Giuliani, 2014).

### 3.2 Respuestas fisiológicas y bioquímicas frente al ibuprofeno y la carbamazepina moduladas por la temperatura

Los resultados obtenidos en este apartado han sido publicados en: «*Drugs of environmental concern modify Solea senegalensis physiology and biochemistry in a temperature-dependent manner*». González-Mira, A., Varó, I., Solé, M., y Torreblanca, A. (2016). *Environ Sci Pollut Res*, 23, 20937-20951. doi:10.1007/s11356-016-7293-x

En la Tabla 3.4 se presentan los valores de los parámetros biométricos determinados al final del experimento. No se registró mortalidad en ninguno de los grupos experimentales, y los ejemplares de cada grupo mostraron peso y tamaño similares. El índice hepatosomático (HSI) fue significativamente mayor en peces mantenidos a 15 °C que en los mantenidos a 20 °C, pero no se encontró ningún efecto debido al tratamiento.

Tabla 3.4. Medias  $\pm$  SD de los parámetros biométricos de los ejemplares mantenidos a las dos temperaturas (15 y 20 °C) y bajo los diferentes tratamientos.

Grupo	Control		Aceite de girasol		Ibuprofeno		Carbamazepina	
	T15	T20	T15	T20	T15	T20	T15	T20
N (M:H)	8 (4:4)	8 (5:3)	6 (1:5)	6 (4:2)	6 (2:4)	6 (4:2)	6 (2:4)	6 (5:1)
Longitud total (cm)	25,8 $\pm$ 1,71	26,6 $\pm$ 1,24	25,3 $\pm$ 1,21	24,9 $\pm$ 1,24	26,3 $\pm$ 0,52	26,0 $\pm$ 1,87	26,2 $\pm$ 1,47	27,2 $\pm$ 1,72
Peso total (g)	268,8 $\pm$ 45	288,4 $\pm$ 34,3	252,7 $\pm$ 36,1	254,8 $\pm$ 34,5	273,7 $\pm$ 31,8	253 $\pm$ 26,4	286,3 $\pm$ 37,2	264,8 $\pm$ 36,9
HSI	1,01 $\pm$ 0,17	0,70 $\pm$ 0,10	0,97 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,15	0,90 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,11

HSI = Índice hepatosomático, determinado como (peso hígado/peso total) x 100.

Valores analizados mediante un ANOVA de una vía, seguido de una prueba *post hoc* SNK para determinar el efecto de las temperaturas de aclimatación y de los fármacos ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.1 Parámetros plasmáticos

Los valores de las concentraciones de glucosa y lactato en plasma se presentan en la Tabla 3.5. Los valores obtenidos se asemejan a los hallados en otros estudios realizados en la misma especie (Arjona *et al.* 2011, Costas *et al.* 2012). Como puede observarse en la Tabla 3.6, los niveles de glucosa y lactato mostraron diferencias significativas como consecuencia de los tratamientos ( $p < 0,01$ ). Los niveles de glucosa se vieron afectados además por la temperatura de aclimatación (Tabla 3.6,  $p < 0,01$ ).

La administración del aceite de girasol como disolvente de los fármacos fue probablemente la causa principal de la disminución de las concentraciones de glucosa y lactato plasmáticas (Tabla 3.5) observada en aquellos grupos sometidos a inyección. En trucha arco iris (*O. mykiss*) se observó una disminución en los niveles glucosa plasmática tras la administración de ácidos grasos (Librán-Pérez *et al.* 2013). Aunque esta respuesta sigue sin estar del todo entendida desde un punto de vista fisiológico en peces, se ha sugerido que podría estar relacionada, con la estimulación de la secreción de insulina, y el consecuente descenso de la glucosa plasmática, en presencia de ácidos grasos (Librán-Pérez *et al.* 2013), al igual que sucede en humanos (Boden 2005). Sin embargo, la disminución de glucosa debida a la administración del aceite como disolvente solo se observó en los peces aclimatados a 15 °C. Los niveles de lactato en plasma aumentaron en los animales que recibieron la administración de IB y CBZ (Tabla 3.5). El aumento encontrado en los niveles plasmáticos de lactato tras las inyecciones de los fármacos podría estar relacionado con la activación del metabolismo anaeróbico, debido al estrés causado por los fármacos.

Tabla 3.5. Medias  $\pm$  SEM (error estándar) de los parámetros plasmáticos determinadas en *S. senegalensis* mantenidos a las dos temperaturas (15 y 20 °C) y bajo los diferentes tratamientos.

Tejido	Grupo	Control		Aceite de girasol		Ibuprofeno		Carbamazepina	
		T15	T20	T15	T20	T15	T20	T15	T20
Plasma	Temperatura (°C)								
	Glucosa (mmol/L)	4,01 $\pm$ 0,48b	2,96 $\pm$ 0,18b	1,26 $\pm$ 0,08a	2,23 $\pm$ 0,17b	1,59 $\pm$ 0,16ab	2,22 $\pm$ 0,11b	2,19 $\pm$ 0,57ab	2,37 $\pm$ 0,6ab
	Lactato (mmol/L)	0,58 $\pm$ 0,11ab	0,54 $\pm$ 0,15ab	0,14 $\pm$ 0,03a	0,21 $\pm$ 0,11ab	0,27 $\pm$ 0,08a	0,56 $\pm$ 0,18ab	0,29 $\pm$ 0,04ab	0,69 $\pm$ 0,06ab
	GOT (U/L)	5,66 $\pm$ 0,72	6,17 $\pm$ 0,52	6,22 $\pm$ 0,84	5,15 $\pm$ 0,89	5,34 $\pm$ 0,7	5,06 $\pm$ 0,28	6,1 $\pm$ 1,42	5,98 $\pm$ 0,86
	$\gamma$ -GT (U/L)	1,73 $\pm$ 0,61	1,58 $\pm$ 0,43	1,53 $\pm$ 0,31	3,16 $\pm$ 0,2	2,86 $\pm$ 0,53	1,54 $\pm$ 0,36	1,32 $\pm$ 0,17	2,88 $\pm$ 0,37

Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre los ocho grupos experimentales tras un ANOVA de una vía y un test *post hoc* SNK para cada parámetro, excepto para glucosa y lactato, donde se aplicó el test *post hoc* Games-Howell, ( $p < 0,05$ ).

No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las transferasas analizadas en el plasma (GOT y  $\gamma$ -GT) para ninguno de los factores experimentales (Tabla 3.6). La ausencia de respuesta en las actividades AST y  $\gamma$ -GT en el plasma (Tabla 3.5), empleadas como indicadores sensibles de daño celular y disfunción hepática, indica que la administración de IB o CBZ en *S. senegalensis*, en las condiciones ensayadas, no produce hepatotoxicidad. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en el pez *Cirrhinus mrigala*, sí observaron alteraciones en los niveles plasmáticos de GOT tras una exposición a 14,2 mg/l de IB disuelto en el agua durante un periodo de tiempo comprendido entre 7 y 35 días (Saravanan *et al.* 2012).

El tratamiento fue responsable de un aumento en los niveles de amoníaco y osmolalidad plasmáticos (Tabla 3.6;  $p < 0,001$ ), mientras que la temperatura de aclimatación no produjo ningún efecto. Los peces inyectados con IB o CBZ presentaron los niveles de osmolalidad plasmática más elevados (Fig. 3.6). Al igual que el resto de peces teleósteos marinos *S. senegalensis* es amoniotélico e hipoosmótico. Su carácter hipoosmótico conlleva una ganancia pasiva de iones desde el medio circundante y una pérdida osmótica de agua que debe contrarrestar con mecanismos osmorreguladores, entre los que se encuentra la expulsión activa de iones a través de canales de  $\text{Na}^+$  en células especializadas (Hill *et al.* 2006).

Estudios previos han encontrado la implicación de la CBZ en la disfunción en los sistemas de transporte de iones situados en los epitelios osmorreguladores de peces y anfibios (Li *et al.* 2009; Suwalsky *et al.* 2006). Dichos estudios sugieren que las causas más probables de la disfunción son el daño peroxidativo causado por la CBZ y su efecto inhibitor sobre el transporte de  $\text{Na}^+$ . También se ha visto en humanos que muchos fármacos, incluida la CBZ, están relacionados

con el síndrome de secreción inapropiada de la hormona antidiurética (HAD), la arginina vasopresina (AVP) (Jones 2007; Velasco Cano y Runkle de la Vega, 2010). En peces, la neurohipófisis produce la hormona arginina vasotocina (AVT), equivalente a la AVP de los mamíferos, que interviene en el control endocrino del balance de agua y sales debido a su acción a nivel renal y/o branquial. Aunque el mecanismo de acción de la AVT puede diferir al descrito para la hormona equivalente en mamíferos, la función antidiurética final en peces podría ser la misma (Balment *et al.* 1993).

El aumento en la osmolalidad en los ejemplares de lenguado inyectados con IB indica un efecto de este fármaco sobre la osmorregulación. Resultados similares han sido descritos en trucha arcoíris por Gravel *et al.* (2009). Dado el mecanismo de acción del IB en cuanto a la inhibición de la síntesis de PGs, y el importante papel de las PGs en los procesos de osmorregulación (Borsick *et al.* 2006; Grosser *et al.* 2002; Van Praag *et al.* 1987), no es de extrañar que este fármaco interfiera con dichos procesos. Además, el consumo de IB también se ha asociado con el síndrome de secreción inapropiada de la hormona antidiurética, aunque solo en casos clínicos raros (Artom *et al.* 2013; Jones 2007; Roche *et al.* 2013). Cabe destacar que, aunque las diferencias de osmolalidad en los aclimatados a las dos temperaturas no sean estadísticamente significativas, puede observarse un aumento de la osmolalidad con la temperatura. Este hecho podría deberse al efecto de la temperatura en los procesos osmorreguladores que se desencadenan en el organismo para mantener la homeostasis, debido al carácter ectotérmico de *S. senegalensis*. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otro estudio realizado en la misma especie, en el que, a pesar del aumento de los niveles de osmolalidad con la temperatura, las diferencias encontradas entre dichos niveles no fueron significativas (Arjona *et al.* 2010). En

cuanto a los niveles de amoníaco en plasma, la administración tanto de CBZ como de IB causó un aumento significativo en las dos temperaturas ensayadas (Fig. 3.6). Debido a la toxicidad inherente del amoníaco, es esencial el correcto funcionamiento de los mecanismos responsables de su eliminación. Como se ha comentado anteriormente, en los peces teleósteos las funciones de osmorregulación y de excreción del amoníaco se localizan principalmente en el epitelio de las branquias. La disrupción osmótica, probablemente debida a la pérdida de agua en presencia de los fármacos, podría ser la razón de las elevadas concentraciones de amoníaco encontradas en el plasma de los peces inyectados con IB o CBZ. Sin embargo, no puede descartarse la posible existencia de cambios específicos, inducidos por estos fármacos, en las vías metabólicas implicadas en la formación de amoníaco.

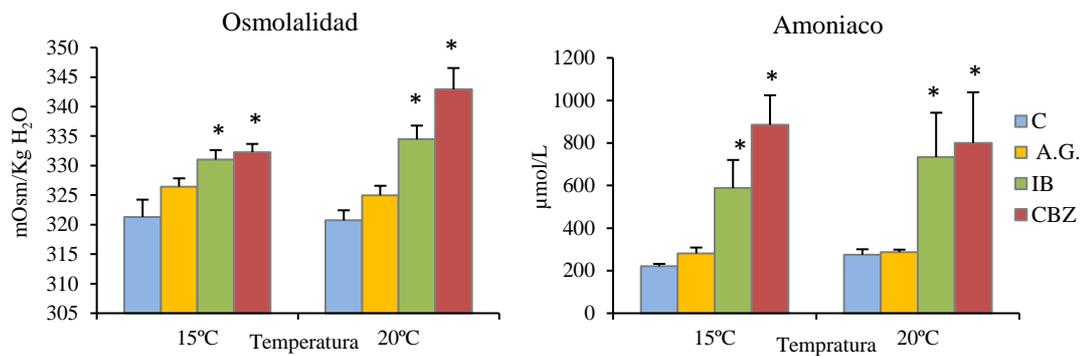


Figura 3.6. Medias  $\pm$  SD de los valores plasmáticos de osmolalidad y amoníaco de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C) y bajo los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G.), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ). Los asteriscos indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre grupos (ANOVA de una vía y *post hoc* SNK).

Los valores de creatinina plasmática se presentan en la Figura 3.7. Los análisis estadísticos demuestran un efecto derivado de los tratamientos (Tabla 3.6;  $p < 0,05$ ), independientemente de la temperatura de aclimatación. El análisis *post hoc* SNK reveló que las diferencias fueron significativas en los peces inyectados con CBZ, pero sólo en los aclimatados a 20 °C (Fig. 3.7) . La creatinina es un desecho metabólico generado por la actividad muscular, normalmente en una tasa muy constante, y los riñones se encargan de filtrarla para ser eliminada por la orina. Por ello, los niveles elevados de creatinina obtenidos en el plasma pueden ser indicativos de un mal funcionamiento renal. Además, como se ha comentado anteriormente, el tratamiento con CBZ está relacionado con el síndrome de la secreción inapropiada de la AVP, el equivalente de la AVT de los peces. Algunos estudios realizados en especies de teleósteos eurihalinos sugieren que la AVT puede actuar de manera antidiurética, restringiendo la producción de orina (Balment *et al.* 1993). Todo esto podría llevar a pensar que un mecanismo similar al descrito para la secreción inapropiada de la AVP impulsada por la CBZ en humanos puede tener lugar en los peces inyectados con CBZ, pudiendo causar algún tipo de alteración en la excreción de creatinina. Sin embargo, el efecto de dependencia entre la temperatura y el aumento de creatinina en plasma es desconocida.

Tabla 3.6. Valores de la estadística del ANOVA (F) de dos vías y de los test de estadística no paramétrica (valores de Z (a) y valores de Chi (b)) de cada parámetro determinado en el experimento, para analizar la influencia de las variables temperatura y tratamiento, y su interacción, seguidos de los valores obtenidos tras aplicar el análisis *post hoc* t de Student para la temperatura (T).

Tejido	Parámetro	Temperatura (gl=1)	Tratamiento (gl=3)	Temp * Tratam (gl=3)
		Valores de F/ Valores de Z <sup>(a)</sup>	Valores de F/ Valores de Chi <sup>(b)</sup>	Valores de F
Plasma	Glucosa	1,664** <sup>(a)</sup> (T15>T20)	21,651*** <sup>(b)</sup>	-
	Lactato	n.s. <sup>(a)</sup>	16,69** <sup>(b)</sup>	-
	Amonio	n.s. <sup>(a)</sup>	18,499*** <sup>(b)</sup>	-
	Osmolalidad	n.s.	21,889***	2,84*
	Triglicéridos	25,023*** <sup>(a)</sup> (T15>T20)	11,755***	7,417***
	Creatinina	n.s.	3,897*	n.s.
	GOT	n.s.	n.s.	n.s.
	γ-GT	n.s.	n.s.	5,463**
Citosol hígado	CAT	4,436* (T15>T20)	n.s.	3,759*
	GST	n.s.	n.s.	n.s.
	t-GPX	2,635*** <sup>(a)</sup> (T15<T20)	n.s. <sup>(b)</sup>	-
	GR	n.s.	n.s.	n.s.
Microsomas hígado	EROD	3,467*** <sup>(a)</sup> (T15>T20)	n.s. <sup>(b)</sup>	-
	MROD	47,061*** (T15>T20)	4,668**	4,445**
	CECOD	31,314*** (T15>T20)	4,763**	3,364*
	BFCOD	15,752*** (T15>T20)	3,092*	n.s.
	NADPH cit c red.	30,62*** (T15>T20)	n.s.	n.s.
	NADH cit b <sub>5</sub> red.	32,991*** (T15>T20)	n.s.	n.s.
	UDPGT	3,19*** <sup>(a)</sup> (T15>T20)	8,229* <sup>(b)</sup>	-
Músculo	HSP70	n.s.	3,741*	n.s.

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

gl = grados de libertad. n.s. = diferencias no significativas.

En la Figura 3.7 también se presentan las concentraciones plasmáticas de triglicéridos obtenidas al final del experimento. El análisis estadístico evidenció un efecto derivado tanto de la temperatura como del tratamiento, al igual que una clara interacción entre ambos factores (Tabla 3.6;  $p < 0,001$ ). La prueba *post hoc* destacó que el grupo de peces inyectados con IB y aclimatados a 20 °C presentaron unos valores de triglicéridos diferentes a la media del resto de grupos. Sin embargo, los inyectados con el disolvente (A.G.) y la CBZ aclimatados a dicha temperatura presentaron un descenso muy acusado de triglicéridos respecto al grupo control y a los peces inyectados aclimatados a la temperatura más baja (Fig. 3.7). Los peces, incluyendo *S. senegalensis*, se caracterizan por la movilización de lípidos, entre ellos los triglicéridos, como resultado de la sustitución del metabolismo de los carbohidratos por el de los lípidos durante la aclimatación a temperaturas bajas (Arjona *et al.* 2010). Este hecho podría explicar la diferencia observada en los niveles de triglicéridos en función de la temperaturas de aclimatación, siendo mayores en los peces aclimatados a la temperatura más baja (Tabla 3.6). Las bajas concentraciones de triglicéridos encontradas en el plasma de los peces aclimatados a 20 °C e inyectados con el aceite y la CBZ respecto del control sugieren un efecto debido a la administración del aceite, y no a la del fármaco. Por el contrario, el grupo de peces inyectados con IB y mantenidos a 20 °C no reflejaron cambios en los niveles de triglicéridos. Una de las posibles causas del aumento de triglicéridos en presencia de IB podría deberse a la conversión quirál que sufre este fármaco en el organismo, ya que genera compuestos intermedios que se incorporan a los triglicéridos libres, afectando al metabolismo de los lípidos, tal como sucede en humanos (Rainsford 2005).

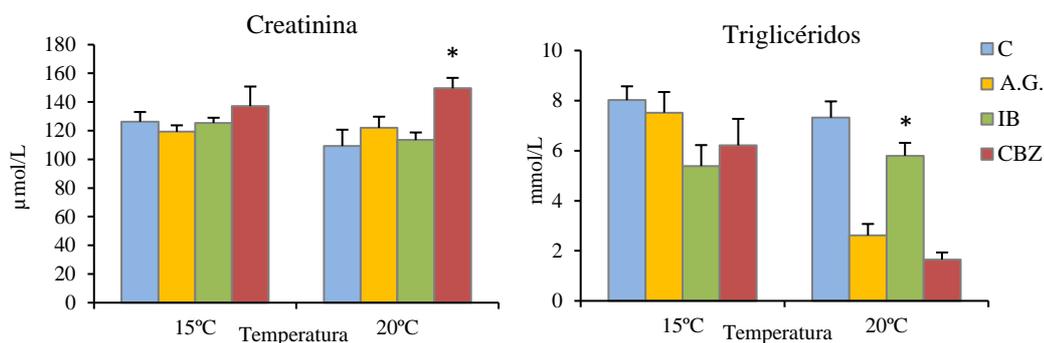


Figura 3.7. Medias  $\pm$  SD de los valores plasmáticos de creatinina y triglicéridos de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C) y bajo los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G.), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ). Los asteriscos indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre grupos (ANOVA de una vía y *post hoc* SNK).

### 3.2.2 Enzimas hepáticas

Como puede observarse en la Tabla 3.6, todas las actividades enzimáticas analizadas en la fracción microsomal del hígado mostraron diferencias significativas como consecuencia de la temperatura de aclimatación ( $p < 0,001$ ). Además, todas las actividades enzimáticas relacionadas con el citocromo P450, MROD, CECOD y BFCOD, a excepción de la actividad EROD, presentaron también un efecto producido por el tratamiento con fármacos ( $p < 0,05$ ). Los resultados estadísticos determinaron una interacción significativa entre ambos factores experimentales para las actividades MROD y CECOD ( $p < 0,05$ ). En la Tabla 3.7 se presentan los valores obtenidos para las todas las actividades hepáticas relacionadas con biotransformación y la protección antioxidante, excepto las actividades BFCOD y UDPGT. La actividad MROD disminuyó

debido a las inyecciones, incluyendo la de aceite de girasol, aunque solo en los peces aclimatados a 15 °C, hecho que refleja la interacción entre temperatura y tratamiento constatada por el análisis del ANOVA de 2 vías. De forma similar, la inyección con el aceite causó una disminución de la actividad CECOD en los peces aclimatados a 15 °C, pero hubo un aumento en dicha actividad en los peces inyectados con CBZ y mantenidos a la misma temperatura de aclimatación (Tabla 3.7). Como se observa en la Figura 3.8, la actividad BFCOD aumentó tras la administración de ambos fármacos en los peces aclimatados a 15 °C, aunque la prueba *post hoc* SNK evidenció que el aumento de dicha actividad solo fue significativo en los peces inyectados con IB. En la Tabla 3.6 puede verse que la actividad de fase II UDPGT se vio afectada tanto por la temperatura de aclimatación ( $p < 0,001$ ), como por el tratamiento ( $p < 0,05$ ). Dicha actividad fue mayor en los peces aclimatados a 15 °C, y la prueba *post hoc* SNK determinó que la inyección de ambos fármacos causó una disminución de la UDPGT, independientemente de la temperatura de aclimatación (Fig. 3.8). La temperatura fue el único factor que tuvo un efecto significativo sobre las actividades antioxidantes CAT y t-GPX determinadas en la fracción citosólica del hígado (Tabla 3.6;  $p < 0,05$ ). El ANOVA de dos vías aplicado a estos resultados mostró que había interacción significativa entre temperatura y tratamiento en la actividad CAT ( $p < 0,01$ ), que se refleja en una mayor actividad en todos los grupos experimentales aclimatados a 15 °C, excepto en el grupo inyectado con CBZ, en la que la actividad CAT fue mayor en los aclimatados a 20 °C. Ni la temperatura ni la administración de los fármacos tuvieron efecto sobre las actividades GST y GR.

Tabla 3.7. Medias  $\pm$  SEM (error estándar) de los valores de las actividades de las enzimas de biotransformación hepáticas determinadas en *S. senegalensis* mantenidos a las dos temperaturas (15 y 20 °C) y bajo los diferentes tratamientos.

Tejido	Grupo	Control		Aceite de girasol		Ibuprofeno		Carbamazepina	
		T15	T20	T15	T20	T15	T20	T15	T20
Citosol hígado	CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	231,18 $\pm$ 10,8ab	202,45 $\pm$ 11,06ab	259,36 $\pm$ 8,43b	196,1 $\pm$ 16,33a	212,79 $\pm$ 14,72ab	179,11 $\pm$ 19,37a	176,7 $\pm$ 19,37a	213,49 $\pm$ 18,4ab
	GST ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	341,23 $\pm$ 16,24	275,25 $\pm$ 18,1	296,25 $\pm$ 11,78	292,89 $\pm$ 21,89	337,59 $\pm$ 26,97	323,46 $\pm$ 35,52	310 $\pm$ 18,08	335,01 $\pm$ 10,54
	t-GPx ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	26,48 $\pm$ 3,12a	36,65 $\pm$ 3,44ab	24,27 $\pm$ 3,48a	36,13 $\pm$ 2,49ab	24,69 $\pm$ 1,12a	39,5 $\pm$ 4,36ab	27,12 $\pm$ 1,11a	47,13 $\pm$ 4,14b
	GR ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	30,83 $\pm$ 3,36	27,51 $\pm$ 1,58	30,88 $\pm$ 2,56	29,1 $\pm$ 1,44	31,31 $\pm$ 2,4	28,46 $\pm$ 2,1	35,08 $\pm$ 3,05	35,51 $\pm$ 1,61
Microsomas hígado	EROD ( $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	32,93 $\pm$ 3,80	8,37 $\pm$ 1,05	18,57 $\pm$ 1,09	7,13 $\pm$ 0,80	23,09 $\pm$ 1,80	7,26 $\pm$ 1,01	19,44 $\pm$ 2,46	6,07 $\pm$ 1,13
	MROD ( $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	10,23 $\pm$ 1,12b	3,12 $\pm$ 0,68a	5,58 $\pm$ 0,5a	3,73 $\pm$ 0,47a	5,97 $\pm$ 1,03a	2,5 $\pm$ 0,73a	5,92 $\pm$ 0,6a	2,76 $\pm$ 0,66a
	CECOD ( $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	46,99 $\pm$ 5,35c	19,28 $\pm$ 2,96a	23,03 $\pm$ 3,13ab	18,5 $\pm$ 1,54a	29,16 $\pm$ 4,63ab	15,24 $\pm$ 2,3a	35,71 $\pm$ 4,74b	20,87 $\pm$ 2,89a
	NADPH-cit c reductasa ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	26,66 $\pm$ 5,13b	20,42 $\pm$ 2,8ab	23,64 $\pm$ 3,31ab	20,75 $\pm$ 5,43ab	25,91 $\pm$ 2,66b	18,77 $\pm$ 4,42a	25,98 $\pm$ 3,14b	17,77 $\pm$ 3,64a
	NADH-cit b <sub>5</sub> reductasa ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	78,33 $\pm$ 6,64	57,68 $\pm$ 4,06	79,84 $\pm$ 5,16	60,42 $\pm$ 4,70	89,28 $\pm$ 5,89	66,85 $\pm$ 3,89	94,51 $\pm$ 6,43	67,70 $\pm$ 5,54

Letras distintas denotan diferencias estadísticas entre los ocho grupos experimentales tras un ANOVA de una vía y un test *post hoc* SNK para cada parámetro, excepto para t-GPx y EROD, donde se aplicó el test *post hoc* Games-Howell, ( $p < 0,05$ ).

La temperatura tuvo un efecto claro sobre las enzimas involucradas en los mecanismos de biotransformación en *S. senegalensis*, corroborando los resultados obtenidos en la primera parte del presente trabajo, incluyendo también el sistema de monooxigenasas dependientes de CYP (Tabla 3.7). Este grupo de enzimas, la NADPH-citocromo *c* reductasa y la NADH-citocromo *b*<sub>5</sub> reductasa, son parte del mismo sistema de biotransformación que el resto de enzimas hepáticas analizadas (Waskell y Kim, 2015), por lo que su respuesta concomitante a la temperatura garantiza el correcto funcionamiento de todo el sistema de biotransformación durante un desafío de temperatura.

En cuanto a los efectos inducidos por los fármacos, en primer lugar se discutirán brevemente los resultados obtenidos respecto al efecto causado por la exposición al IB en las diferentes enzimas relacionadas con los procesos de biotransformación. De todas las enzimas relacionadas con las CYP analizadas, la actividad BFCOD fue la única inducida tras la inyección de IB en *S. senegalensis*, detectándose solo en los peces aclimatados a 15 °C (Fig. 3.8). Tal y como ya se ha comentado en esta Tesis, el IB experimenta un proceso de biotransformación vía citocromo P450 (CYP) 2C9 y 2C8 (fase I), actuando sobre las isoformas S (+) y R (-) respectivamente (López-Rodríguez *et al.* 2008), seguido de una glucuronidación (fase II) en el hígado de humanos (Hamman *et al.* 1997; Rainsford 2012). Sin embargo, no podemos asumir que los procesos de biotransformación en los peces sigan los mismos mecanismos que en los mamíferos, ya que los peces no tienen las mismas isoformas de la familia CYP2 (Uno *et al.* 2012). Algunos estudios han detectado metabolitos del compuesto parental del IB en diferentes especies, como el estudio realizado por Jones *et al.* (2012) en larvas de pez cebra (*Danio rerio*), donde se demostró que la

metabolización y la excreción del IB son dependientes del citocromo P450 (CYP). Además, Brozinski *et al.* (2013) identificaron varios metabolitos generados durante las fases I y II del proceso de biotransformación del IB en la bilis de la trucha arco iris (*O. mykiss*), tras la exposición al IB administrado tanto vía IP como disuelto en el agua. Ambos estudios sugieren que los sistemas responsables del metabolismo de los productos farmacéuticos en los peces son similares a los descritos en los mamíferos. Otros estudios basados en experimentos *in vitro* en peces han conseguido cuantificar la tasa de biotransformación del IB (Gomez *et al.* 2010), y proporcionar información sobre la forma en que el IB interfiere con algunas actividades enzimáticas del citocromo P450 (Gomez *et al.* 2011; Thibaut *et al.* 2006). Sin embargo, hasta el momento no se conoce si en peces la exposición *in vivo* al IB puede inducir la síntesis de las enzimas relacionadas con el citocromo P450, aunque en un modelo de hepatocitos primarios de carpa (*Cyprinus carpio*) revela el papel del IB en la inducción del receptor X del pregnano (PXR), implicado en la síntesis de la CYP3A4 (Corcoran *et al.* 2012).

Por otro lado, como sugieren los resultados obtenidos por Gomez *et al.* (2011), las isoformas del CYP1A (EROD y MROD) pueden ser las responsables de los procesos de biotransformación de fase I del IB en la trucha arco iris (*O. mykiss*). A partir de nuestros resultados podemos deducir que las enzimas de tipo CYP3A4 (BFCOD) podrían estar involucradas en el proceso de biotransformación del IB en *S. senegalensis*, debido a la inducción de la actividad BFCOD (Fig. 3.8) y a la falta de respuestas en las isoformas del CYP1A observadas en este trabajo tras la administración *in vivo* del IB (Tabla 3.7). Además, en la enantioselectividad de la acción farmacéutica del IB puede subyacer la dependencia de la temperatura en la respuesta observada. En el trabajo de Lee *et*

al. (1995), demostraron que la conversión quiral que sufre el IB en el organismo depende de la temperatura, lo que podría favorecer la abundancia de uno de los dos enantiómeros en los seres humanos (Tan *et al.* 2002). El hecho de que la inducción de la actividad BFCOD en *S. senegalensis* sólo fuera patente en los peces aclimatados a 15 °C, puede llevarnos a pensar que la temperatura de aclimatación también podría favorecer la abundancia de uno de los dos enantiómeros en esta especie, a pesar de que necesitaríamos de estudios más detallados que permitieran apoyar esta suposición.

Un estudio *in vitro* llevado a cabo en células microsomales hepáticas de carpa (*C. carpio*) reveló una inhibición de la actividad de fase II UDPGT tras incubar dichas células con IB (Thibaut *et al.* 2006). En los resultados presentados en esta Tesis, los peces inyectados con IB mostraron una menor actividad UDPGT en comparación con sus grupos control y los inyectados con aceite, independientemente de la temperatura de aclimatación (Fig. 3.8). Aceña (comunicación personal) identificó varios metabolitos de fase II del IB, como conjugaciones de glucurónido y taurina, en la bilis de los mismos ejemplares utilizados en el presente estudio, evidenciando que los peces inyectados con IB habían sufrido un proceso de biotransformación de fase II. Por otro lado, el IB no causó ninguna variación en las actividades antioxidantes (t-GPx, CAT y GR), ni en la actividad GST en *S. senegalensis* (Tabla 3.7). La falta de respuestas observada en cualquiera de las actividades antioxidantes difiere con los resultados obtenidos en otro estudio llevado a cabo en pez cebra (*D. rerio*), donde el tratamiento con IB aumentó la actividad t-GPx (Bartoskova *et al.* 2013).

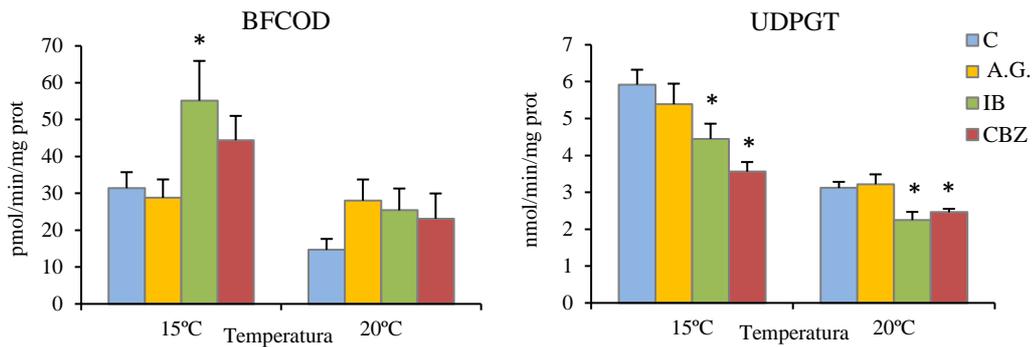


Figura 3.8. Medias  $\pm$  SD de las actividades hepáticas BFCOD y UDPGT de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C) y bajo los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G.), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ). Los asteriscos indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre grupos (ANOVA de una vía y *post hoc* SNK).

No se encontró un efecto dependiente del IB sobre los niveles de HSP70 en el músculo de *S. senegalensis* (Tabla 3.6). Estos resultados contrastan con los obtenidos en alevines de trucha (*O. mykiss*), que sí presentaron una inducción en los niveles de HSP70, tanto en el hígado como en las branquias, tras una exposición a IB disueltos en el agua durante 4 días (Gravel y Vijayan, 2007).

A continuación se discuten los resultados obtenidos en relación con el efecto debido a la exposición a CBZ sobre estas mismas enzimas de biotransformación. Si bien la actividad BFCOD está asociada con la enzima principal responsable de la biotransformación de CBZ en mamíferos, la CYP3A4 (Thorn *et al.* 2011), no se encontraron cambios en la actividad de dicha enzima en *S. senegalensis* como consecuencia de la inyección con CBZ (Fig. 3.8). Al igual que ocurría con el IB, hay evidencias de la biotransformación del compuesto parental de la CBZ en los mismos ejemplares analizados en este trabajo, ya que se

detectaron metabolitos de fase I (hidroxilo) y de fase II (acil glucurónido y taurina) en la bilis de estos peces tras las 48 horas de la inyección con CBZ, con independencia de la temperatura de aclimatación (Aceña, comunicación personal). El hallazgo de una respuesta inhibitoria en la actividad UDPGT debida a la inyección de CBZ en *S. senegalensis*, en ambas temperaturas de aclimatación (Fig. 3.8), no se corresponden con los que cabría esperar, ya que la CBZ ha sido descrita previamente como un potente inductor de la actividad UDPGT en humanos (Riva *et al.* 1996). Los resultados obtenidos podrían plantear la hipótesis de que los metabolitos hidroxilos formados como consecuencia del metabolismo de fase I puedan actuar como inhibidores de la UDPGT, como ocurre con otros hidroxi-metabolitos sobre la UDPGT y las sulfotransferasas (James *et al.* 2008). Pese a no haberse observado una respuesta en ninguna de las actividades antioxidantes analizadas (t-GPx, CAT y GR) tras la administración de CBZ (Tabla 3.7), los resultados obtenidos coinciden con los encontrados en estudios previos en los que se evaluó el estado anti-oxidante hepático de la trucha (*O. mykiss*) tras una exposición crónica de CBZ. Dichos estudios señalan que no hay efecto de la CBZ sobre las actividades antioxidante durante los primeros días de tratamiento, y que estas sólo se vieron alteradas ligeramente después de una exposición a largo plazo al fármaco (Li *et al.* 2010a, b; Li *et al.* 2009). Por el contrario, otros estudios encontraron que las actividades antioxidantes fueron afectadas tras una exposición aguda a CBZ en trucha (*O. Mykiss*) (Li *et al.* 2011), y en el pez sol (*Lepomis gibbosus*) (Brandão *et al.* 2013).

Los niveles de proteínas HSP70 en el músculo se incrementaron después de la inyección de CBZ, en los peces aclimatados a 20 °C (Fig. 3.9). La inducción de las HSP en animales expuestos a CBZ también ha sido descrita en varios

trabajos realizados en bivalvos (Chen *et al.* 2014; Contardo-Jara *et al.* 2011). En humanos, se ha demostrado que la HSP70 protege contra la hipersensibilidad a la CBZ, lo que sugiere que estas proteínas pueden estar de alguna manera involucrados en las vías de acción del CBZ (Alfirevic *et al.* 2006). Cabe destacar que no se encontró ningún efecto individual de la temperatura en los niveles de HSP70 (Tabla 3.6).

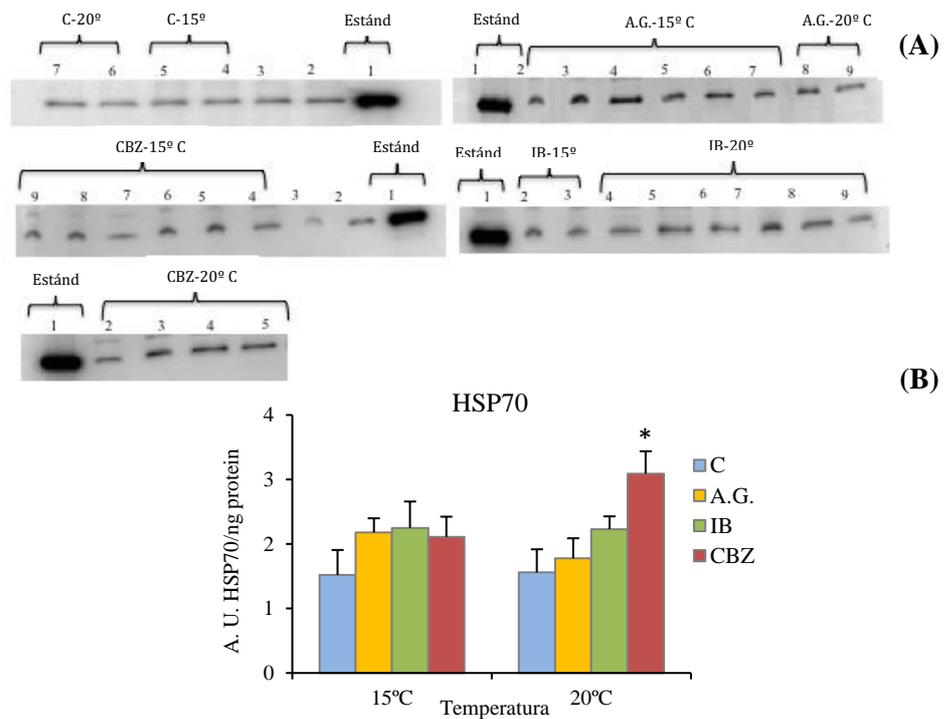


Figura 3.9. (A) Bandas de HSP70 detectadas en músculo por Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal frente a la proteína HSP70 para las diferentes condiciones experimentales. (B) Medias  $\pm$  SD de los niveles de HSP70 determinados en los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C) y bajo los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G.), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ). Los asteriscos indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre grupos (ANOVA de una vía y *post hoc* SNK).

### **3.3 Efectos del ibuprofeno y la carbamazepina sobre el estatus osmorregulatorio, el metabolismo de lípidos y parámetros reproductivos, modulados por la temperatura**

Los resultados obtenidos en este apartado forman parte del manuscrito en preparación «*Effects of ibuprofen and carbamazepine in temperature conditioned juvenile Solea senegalensis: a mechanistic approach*». González-Mira, A., Torreblanca, A., Hontoria, F., Navarro, J. C., Mañanós, E., y Varó, I.

#### *3.3.1 Actividad enzimática y niveles de expresión de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPasa*

Los valores de la actividad NKA determinada en las branquias pueden verse en la Figura 3.10. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas como consecuencia de la administración de los fármacos (Tabla 3.8). Sin embargo, no se encontró ningún efecto causado por la temperatura de aclimatación. El análisis *post hoc* SNK de los resultados desveló que los valores de la actividad branquial NKA fueron mayores en los peces tratados con IB (Fig. 3.10). Tal y como se pudo constatar anteriormente en esta Tesis (apartado 3.2), la administración de IB y de CBZ provocó un aumento de la osmolalidad plasmática en estos mismos ejemplares de *S. senegalensis*. Es conocido que los ionocitos branquiales son capaces de responder directamente a los cambios en los niveles de osmolalidad con el fin de restaurar la homeostasis (Hill *et al.* 2006). Además de estas respuestas, estudios realizados en diferentes especies de teleósteos han encontrado modificaciones en las actividades de enzimas transportadoras de iones, como la bomba NKA, tras experimentar cambios en la salinidad del agua (Bystriansky y Schulte, 2011; Inokuchi *et al.* 2015).

De hecho, un estudio llevado a cabo en ejemplares juveniles inmaduros de *S. senegalensis* encontró que, al ser sometidos a un aumento de salinidad ambiental, los valores de osmolalidad plasmática aumentaban durante el periodo inicial (los 3 primeros días), mientras que la actividad NKA de las branquias no respondía hasta transcurridos 7 días desde el cambio de salinidad (Arjona *et al.* 2007).

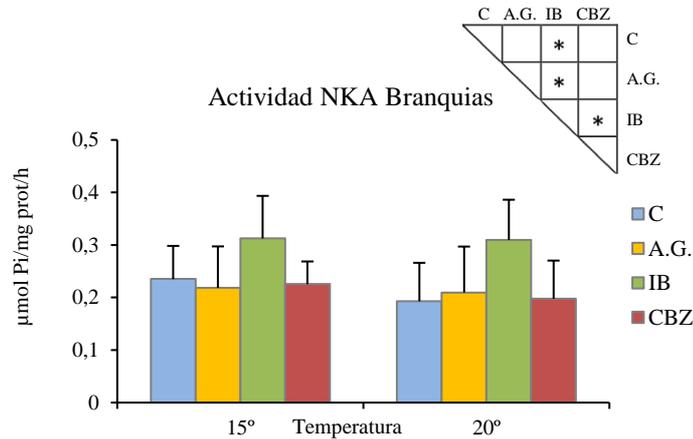


Figura 3.10. Media  $\pm$  SEM de la actividad NKA determinada en las branquias de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), y bajo los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G.), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ). Los asteriscos indican diferencias significativas, fijadas en  $p < 0,05$ , tras el análisis del ANOVA de dos vías y el *post hoc* SNK.

Teniendo en cuenta el corto periodo de exposición al fármaco (48 horas) seleccionado en la presente Tesis, y que el aumento de la actividad NKA de las branquias únicamente se observó en los grupos tratados con IB, y no en los tratados con CBZ, el aumento en la actividad NKA no parece ser debido a un mecanismo de compensación para restaurar la homeostasis después de la elevación de la osmolalidad plasmática, sino a algún mecanismo más específico del IB, no conocido en peces y que se escapa de los objetivos de este estudio. Uno

de los mecanismos responsables de la regulación de cualquier actividad enzimática es la modulación de la transcripción y/o traducción a partir de los genes que codifican dicha proteína (González 2012). Esta respuesta ocurre a nivel molecular y no es inmediata. En la Figura 3.11 se presentan los niveles de expresión de las isoformas 1a y 1b de la subunidad  $\alpha$  de la NKA analizadas en las branquias. El análisis estadístico de los datos evidenció un efecto de la temperatura de aclimatación sobre los niveles de expresión de la isoforma  $\alpha$ 1a de la NKA (Tabla 3.8;  $p < 0,01$ ), pero no se encontró ningún efecto derivado de la exposición a los fármacos. Como se puede observar, se produjo un aumento en la expresión de la isoforma  $\alpha$ 1a en los peces aclimatados a 20 °C.

Los resultados obtenidos evidencian la importancia de la temperatura ambiental para el mantenimiento de la homeostasis en los peces (Arjona *et al.* 2010; Fiess *et al.* 2007), ya que la isoforma  $\alpha$ 1a de la NKA se expresa más en los órganos osmoreguladores en *S. senegalensis* (Armesto *et al.* 2014). Este incremento puede deberse a alteraciones en la permeabilidad de la membrana, con la consiguiente ganancia pasiva de iones, con el fin de aumentar la síntesis de la enzima NKA, encargada del transporte de iones (Smith 1967). Sin embargo, los datos de actividad NKA en branquias parecen no apoyar esta hipótesis. En cuanto a la expresión de la isoforma NKA  $\alpha$ 1b, tal como se puede observar en la Figura 3.11, presenta diferencias significativas debidas al tratamiento con fármacos (Tabla 3.8;  $p < 0,05$ ). El análisis *post hoc* mostró que el grupo control (no inyectado) era el único diferente al resto y que, por tanto, las diferencias se debían a la sustancia inyectada como disolvente (aceite de girasol) y no a un efecto específico de los fármacos. Hay que tener en cuenta que la isoforma  $\alpha$ 1b de la NKA se expresa principalmente en el corazón y el cerebro de *S. senegalensis*

(Armesto *et al.* 2014), y no tanto en los órganos encargados de la osmorregulación, por lo que podría no estar implicada en la capacidad osmorregulatoria.

Por otra parte, la falta de respuestas detectada a nivel molecular en *S. senegalensis* tras la administración de los fármacos en el presente trabajo podría deberse al corto tiempo de exposición, de forma que posibles cambios en la transcripción del gen que codifica la NKA aún no serían detectables. De hecho, Armesto *et al.* (2014) encontraron en *S. senegalensis* que el incremento de la transcripción de la isoforma  $\alpha 1a$  de la NKA se producía 3 días después del cambio de salinidad del agua. Además, un estudio crónico con IB realizado en trucha arcoíris (*O. mykiss*) tampoco encontró cambios en la expresión de la subunidad  $\alpha$  de la NKA en las branquias (Gravel *et al.* 2009).

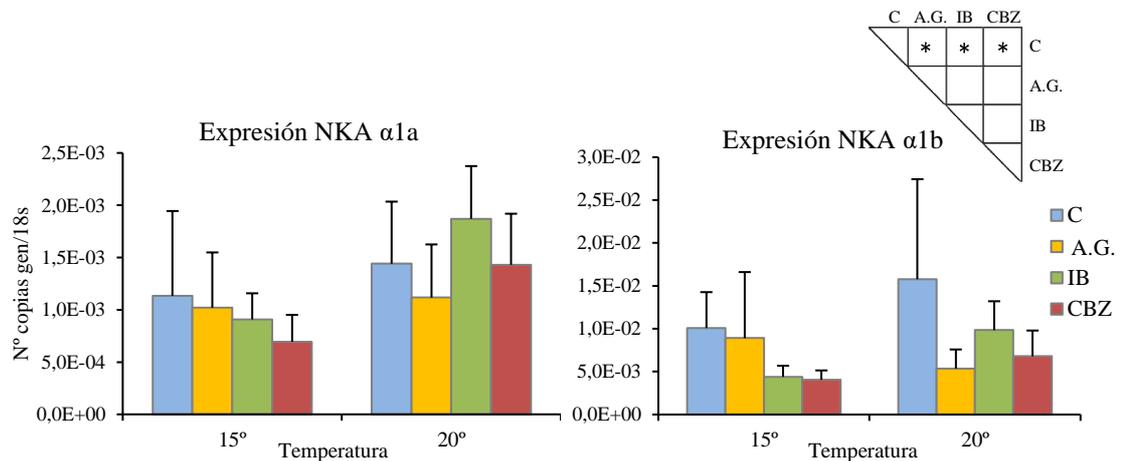


Figura 3.11. Medias  $\pm$  SEM del número de copias de las isoformas  $\alpha 1a$  y  $\alpha 1b$  de la NKA, determinadas en las branquias de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), y bajo los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G.), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ). Los asteriscos indican diferencias significativas, fijadas en  $p < 0,05$ , tras el análisis del ANOVA de dos vías y el *post hoc* SNK.

Otros posibles mecanismos que darían cuenta de un aumento de la actividad NKA sin variar la abundancia de proteínas, son la translocación de unidades NKA entre compartimentos subcelulares, o la modificación en la actividad de las enzimas responsables de la regulación de la NKA (Gonzalez 2012; Pirkmajer y Chibalin, 2016). Como se ha descrito anteriormente, el IB actúa inhibiendo la síntesis de PGs, un mensajero lipídico derivado del AA, a través de la inactivación de su enzima catalítica, la COX. El primer paso por el cual el AA se convierte en el precursor de las PGs es catalizado por la enzima PLA<sub>2</sub>, liberando los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas (Balsinde *et al.* 2002). Varios estudios han demostrado el efecto inhibitorio de los AINEs en la actividad de la PLA<sub>2</sub> (Franson *et al.* 1980, Gaspar *et al.* 2010, Singh *et al.* 2004). En particular, en el estudio de Gaspar *et al.* (2010) evaluaron el efecto inhibitorio del IB a través de los posibles factores que contribuyen a dicha inhibición. Estos incluían cambios biofísicos en la membrana donde actúa la PLA<sub>2</sub> inducidos por el fármaco, y la interacción directa del fármaco con la enzima (cambiando su conformación y/o mediante competencia del sitio catalítico). Finalmente concluyeron que el IB actúa sobre la actividad PLA<sub>2</sub> mediante una combinación de factores que son capaces de inducir cambios conformacionales en la enzima, y cambios biofísicos en la inter-fase lipídica de las membranas inducidos por este fármaco, puesto que dicha actividad está fuertemente condicionada por las propiedades de las mismas. Por lo tanto, la inhibición de la PLA<sub>2</sub> dependiente del IB podría modular la «cascada del AA» (Ghelardoni *et al.* 2004) iniciada por dicha enzima, perturbando así la producción de reguladores naturales de la osmorregulación, como las PGs (Evans y Gunderson, 1998), lo que podría causar un aumento de la actividad NKA. En un trabajo previo realizado con líneas

celulares MDCK (Madin Darby Canine Kidney), Cohen-Luria *et al.* (1994) demostró que el efecto inhibitor de las PGs sobre las unidades activas de la NKA puede ser suprimido por fármacos inhibidores de la COX, como el IB. En consecuencia, si el IB suprime el efecto natural de las PGs, la actividad de la enzima NKA podría verse incrementada, causando el aumento observado en este estudio. Aunque la especie *S. senegalensis* está totalmente adaptada a los posibles desafíos osmorreguladores que puede encontrar en el medio natural (Imsland *et al.* 2003), la exposición y entrada de fármacos en el organismo, tales como el IB, que alteran los mecanismos reguladores, podría comprometer los procesos responsables de dichas adaptaciones.

Los valores de la actividad NKA en el intestino de los diferentes grupos experimentales se presentan en la Figura 3.12. El análisis estadístico mostró que dicha actividad se vio afectada por el tratamiento con fármacos (Tabla 3.8;  $p < 0,05$ ), y el análisis *post hoc* reveló que el grupo de peces tratados con IB mostraba valores diferentes a los del resto (Fig. 3.11). A pesar de la falta de superposición en las barras de desviación en los valores de los grupos tratados con CBZ respecto a los otros grupos experimentales, el análisis estadístico de los datos no mostró diferencias significativas debidas a este tratamiento (Tabla 3.8). Aunque las branquias son el sitio primario en el que se produce el transporte neto de sodio y cloruro (bomba NKA), favoreciendo la secreción de dichas sales en los teleósteos marinos (McCormick 2001), incluido *S. senegalensis*, la mayor actividad de la enzima NKA fue determinada en el intestino. Los resultados obtenidos apoyan a los encontrados previamente por Grossell *et al.* (2006) y respaldan el importante papel del intestino en la capacidad osmorreguladora de los teleósteos eurihalinos. Nuestros resultados han mostrado un aumento de la actividad NKA en el intestino

de los peces inyectados con IB (Fig. 3.12), al igual que ocurría con la actividad NKA de las branquias.

En la Figura 3.12 puede observarse que, aunque el efecto de la temperatura no es estadísticamente significativo (Tabla 3.8), los valores correspondientes a los peces aclimatados a 20 °C son el grupo que más contribuye a establecer el efecto del IB. El hecho de que el aumento de la actividad NKA en el intestino causada por la inyección de IB sea más notorio a 20° C podría estar relacionado con la gran influencia de la temperatura en la composición lipídica de la membrana (Arjona *et al.* 2010; Hazel 1984), destacando así la importancia de dicha estructura en la activación de las enzimas responsables de la actividad NKA (Epanand 1997).

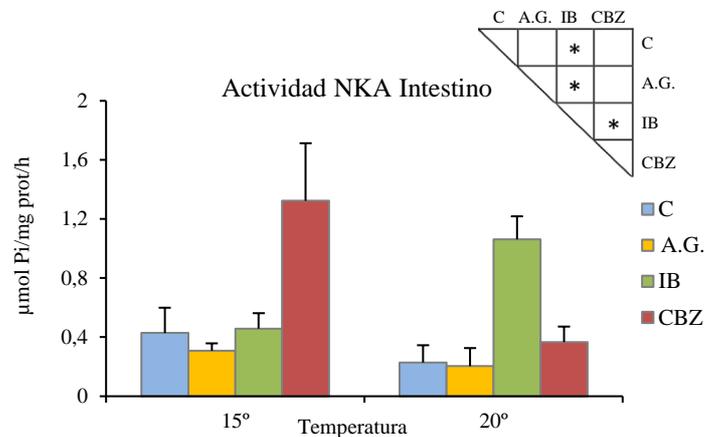


Figura 3.12. Media  $\pm$  SEM de la actividad NKA determinada en el intestino de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), y bajo los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G.), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ). Los asteriscos indican diferencias significativas, fijadas en  $p < 0,05$ , tras el análisis del ANOVA de dos vías y el *post hoc* SNK.

La actividad NKA renal permaneció constante independientemente de las variables experimentales de temperatura de aclimatación y exposición a los fármacos (Fig. 3.13). En estudios previos realizados por Arjona *et al.* (2009, 2007) y Herrera *et al.* (2012), tampoco encontraron una respuesta en la actividad NKA renal de *S. senegalensis* al ser sometida a condiciones variables de salinidad.

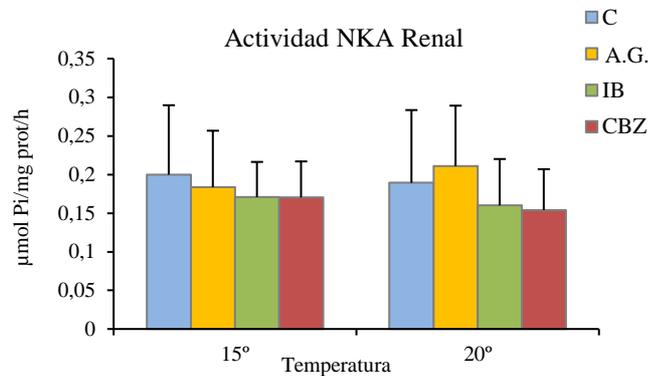


Figura 3.13. Media  $\pm$  SEM de la actividad NKA determinada en los riñones de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), y bajo los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G.), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ). Los asteriscos indican diferencias significativas, fijadas en  $p < 0,05$ , tras el análisis del ANOVA de dos vías y el *post hoc* SNK.

### 3.3.2 Metabolismo de lípidos y cascada del ácido araquidónico

En la Figura 3.14 se presentan los niveles de expresión del gen de la COX-2 determinados en las branquias. El análisis estadístico de los datos (Tabla 3.8) mostró que la expresión de la COX-2 no se vio afectada por ninguno de los dos factores considerados (administración de fármacos y temperatura de aclimatación).

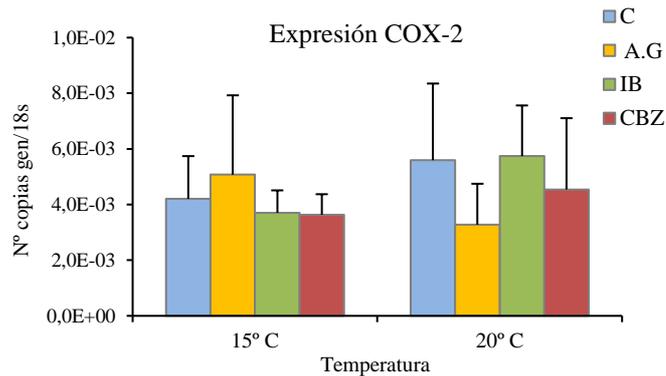


Figura 3.14. Media  $\pm$  SEM del número de copias de la COX-2, determinada en las branquias de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), y bajo los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G.), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ). Los asteriscos indican diferencias significativas, fijadas en  $p < 0,05$ , tras el análisis del ANOVA de dos vías y el *post hoc* SNK.

El ACP de la composición de los ácidos grasos de las branquias para cada grupo experimental no mostró patrones claros de segregación, ya fuera por el tratamiento con fármacos o por los efectos de temperatura de aclimatación (Fig. 3.15). Sin embargo, los resultados del análisis ANOVA de dos vías de los porcentajes de AA revelaron un efecto significativo de ambos factores: tratamiento y temperatura de aclimatación, así como su interacción (Tabla 3.8;  $p < 0,01$ ). La prueba *post hoc* SNK evidenció un efecto dependiente de la temperatura sobre el grupo inyectado con CBZ, ya que los porcentajes de AA fueron significativamente mayores en los peces mantenidos a 15 °C (Fig. 3.16). Del mismo modo, el análisis de los porcentajes de ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) mostró un efecto dependiente de los fármacos, (Tabla 3.8;  $p < 0,001$ ),

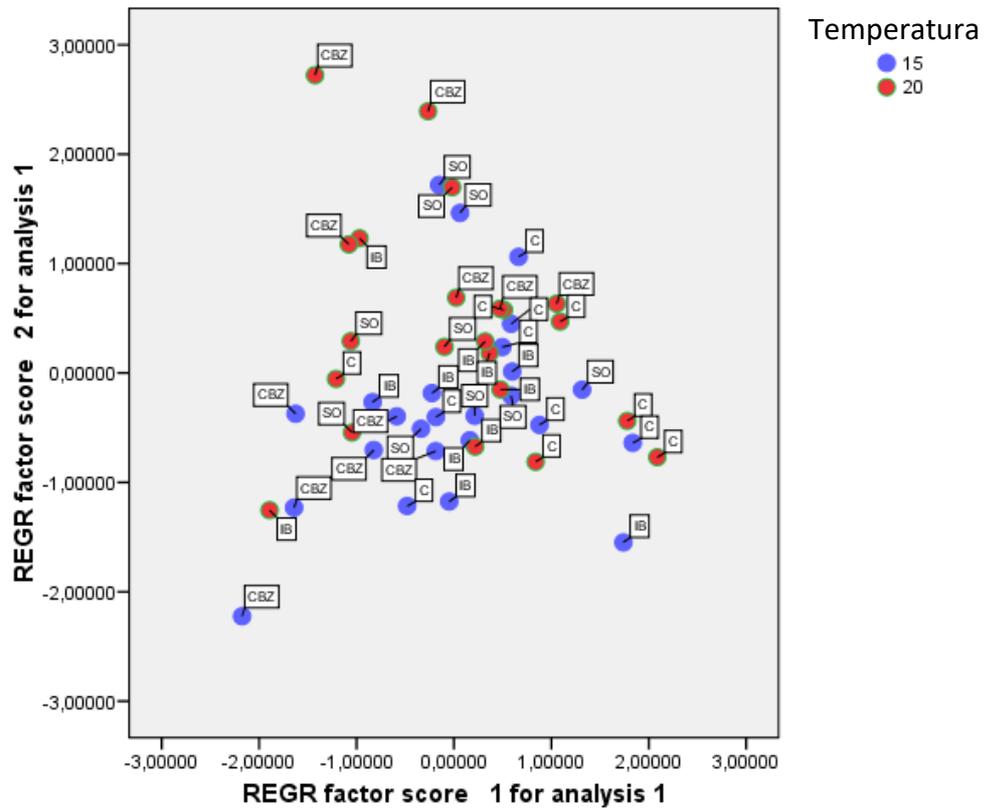


Figura 3.15. Análisis de Componentes Principales (ACP) con los patrones de distribución de los ácidos grasos entre las temperaturas de aclimatación y los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G. como SO), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ), en las branquias de *S. senegalensis*.

y la prueba *post hoc* SNK reveló porcentajes más bajos de EPA en los peces inyectados con CBZ (Fig. 3.16).

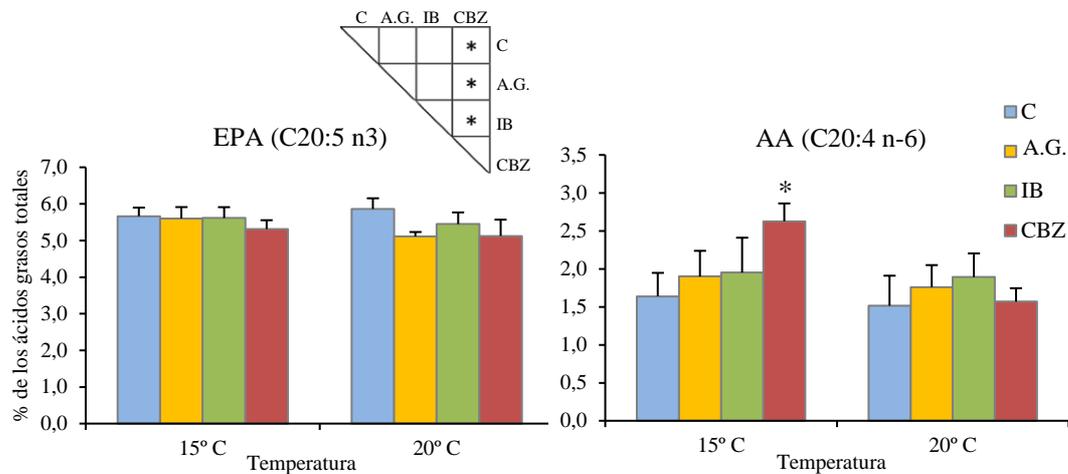


Figura 3.16. Medias  $\pm$  SEM de los porcentajes de los ácidos grasos EPA y AA, determinados en las branquias de los ejemplares mantenidos en dos regímenes de temperatura (15 y 20 °C), y bajo los diferentes tratamientos: control (C), aceite de girasol (A.G.), ibuprofeno (IB) y carbamazepina (CBZ). Los asteriscos indican diferencias significativas, fijadas en  $p < 0,05$ , tras el análisis del ANOVA de dos vías y el *post hoc* SNK.

El hecho de que los resultados muestren un mayor porcentaje de AA en las branquias de los peces inyectados con CBZ podría estar relacionado con una disminución de la actividad enzimática de la COX-2, sin que la expresión del gen que codifica dicha proteína se viera afectada. Como se comentó anteriormente, este tipo de respuesta molecular no sucede de forma inmediata, por lo que la falta de respuesta en los niveles de expresión de la COX-2 (Fig. 3.14) podría estar relacionada con el corto tiempo de exposición de los ejemplares a los fármacos en este estudio. Por otro lado, la acumulación de AA producida únicamente en los

ejemplares aclimatados a 15 °C vuelve a destacar la importancia de la temperatura en la composición lipídica de la membrana de los peces (Hazel 1984). Varios estudios realizados en ratas observaron una reducción tanto en la transcripción del gen que codifica para la COX-2, como en su actividad enzimática, así como una disminución en la conversión de AA en los fosfolípidos de las membranas cerebrales, después de una exposición crónica a CBZ (Gheraldoni *et al.* 2004, Rapoport 2014, 2008; Rapoport y Bosetti 2002). En cambio, los bajos niveles de EPA obtenidos en los peces inyectados con CBZ (Fig. 3.16), coinciden con los resultados de un estudio realizado en pacientes con trastorno bipolar tratados con CBZ (Yuen *et al.* 2008), lo que sugiere una posible asociación directa entre un consumo de CBZ y una disminución en los niveles plasmáticos de ácidos grasos omega-3 de cadena larga, tales como el EPA.

### 3.3.3 Parámetros relacionados con la reproducción

Como se observa en la Tabla 3.9, la distribución al azar de ejemplares entre los grupos experimentales dio lugar a una proporción similar de ejemplares de cada sexo. Los niveles de VTG y de E<sub>2</sub> en plasma fueron indetectables (valores por debajo del nivel de detección del ensayo ELISA) en todos los ejemplares analizados en este estudio. Los niveles de 17,20β-P también fueron indetectables en las hembras, o cercanos al límite de detección del ensayo en los machos (Tabla 3.9). Respecto a los andrógenos analizados en este estudio, los niveles de T y de 11-KT fueron indetectables, o próximos al límite de detección de los ensayos, en todas las hembras de *S. senegalensis*, pero cuantificables en los machos (Tabla 3.9). Dichos niveles no se vieron afectados significativamente por ninguno de los tratamientos. Por el contrario, sí se detectó un efecto derivado de la temperatura en los niveles de 11-KT en los machos (Tabla 3.8;  $p < 0,05$ ), pero no en los

niveles de T. Los niveles de 11-KT fueron significativamente más bajos en los ejemplares expuestos a la temperatura de aclimatación más alta. El GSI fue bajo tanto en las hembras como en los machos, y los valores fueron similares en todas las condiciones experimentales (Tabla 3.9).

Tabla 3.8. Valores de los resultados del ANOVA de dos vías (valores de F) para cada parámetro seleccionado en el experimento para analizar la influencia de los factores temperatura y tratamiento, y su interacción, seguidos de los valores obtenidos tras aplicar el análisis *post hoc* t de Student para la temperatura.

Tejido	Parámetro	Temperatura (gl=1)	Tratamiento (gl=3)	Temp * Tratam (gl=3)
		Valores de F	Valores de F	Valores de F
Branquia	Actividad NKA	n.s	5,52**	n.s
Intestino		n.s	4,13*	n.s
Riñón		n.s	n.s	n.s
Branquia	NKA $\alpha$ 1a	10,77** (T15<T20)	n.s	n.s
	NKA $\alpha$ 1b	n.s	3,82*	n.s
	COX-2	n.s	n.s	n.s
	% AA	12,88*** (T15>T20)	5,54**	6,37***
	% EPA	n.s	7,55***	n.s
Plasma	T (M)	n.s	n.s	n.s
	11-KT (M)	5,66* (T15>T20)	n.s	n.s
Hígado	GSI	n.s	n.s	n.s

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

n.s = diferencias no significativas; gl = grados de libertad; M = machos

En las especies de zonas templadas, como *S. senegalensis*, la temperatura del agua es uno de los principales factores ambientales que controlan la reproducción (Migaud *et al.* 2010; Pankhurst y Munday, 2011). La temperatura actúa directamente sobre la biosíntesis, la secreción y el metabolismo hormonal. El efecto de la temperatura sobre la secreción de esteroides sexuales encontrado en este estudio fue dependiente del sexo, hecho notorio en los niveles de 11-KT de los machos (Tabla 3.9). Esta dependencia podría estar relacionada con los procesos reproductivos, teniendo en cuenta que los ejemplares empleados en este trabajo tenían 2 años y los machos ya estaban iniciando la pubertad, mientras que las hembras aún eran inmaduras (la madurez sexual les llega a los 3 años). A esta edad, la exposición a altas temperaturas tendría efectos deletéreos sobre la pubertad y la maduración gonadal, al inhibir la secreción de esteroides sexuales (Wood y McDonald, 1997). Algunos estudios realizados en *S. senegalensis* han evidenciado la influencia de la temperatura del agua en la regulación de su reproducción. Oliveira *et al.* (2011) propusieron la temperatura como la principal señal que *S. senegalensis* emplea para sincronizar con éxito su periodo reproductivo, ya que los niveles de esteroides plasmáticos variaban significativamente entre años, y siempre estaban relacionados con las variaciones naturales de la temperatura del agua.

Tabla 3.9. Niveles de esteroides sexuales en el plasma, y los índices gonadosomáticos (GSI) calculados en hembras (H) y machos (M) de *S. senegalensis*, aclimatados a 15 (T15) o 20 (T20) °C, y bajo los diferentes tratamientos (control, aceite de girasol, ibuprofeno and carbamazepina). Los valores de esteroides por debajo del límite de detección de la metodología empleada se expresan con el valor del límite de detección (<LD).

Esteroides	Control		Aceite de girasol		Ibuprofeno		Carbamazepina	
	T15	T20	T15	T20	T15	T20	T15	T20
T (ng/ml)								
H	0,35 ± 0,00	<0,35	0,41 ± 0,02	<0,35	0,37 ± 0,02	0,39 ± 0,04	0,44 ± 0,04	<0,35
M	1,38 ± 0,53	0,82 ± 0,08	1,12 ± 0	0,85 ± 0,19	1,70 ± 0,46	0,67 ± 0,05	1,49 ± 0,01	0,76 ± 0,10
11KT (ng/ml)*								
H	<0,10	<0,10	0,14 ± 0,04	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
M	2,79 ± 1,87	1,00 ± 0,27	2,34 ± 0	1,06 ± 0,49	2,89 ± 0,14	0,88 ± 0,33	3,21 ± 1,35	0,74 ± 0,05
17,20β-P (ng/ml)								
H	<1,07	<1,07	<1,07	1,11 ± 0,04	<1,07	1,08 ± 0,01	<1,07	<1,07
M	1,52 ± 0,26	<1,07	<1,07	1,18 ± 0,06	1,59 ± 0,52	1,34 ± 0,22	<1,07	<1,07
GSI (%)								
H	1,09 ± 0,07	1,02 ± 0,07	1,11 ± 0,07	1,25 ± 0,05	0,89 ± 0,22	1,08 ± 0	1,06 ± 0,04	1,07 ± 0,03
M	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0

GSI = Índice gonadosomático determinado como (peso gónada/peso total) x 100

\* Diferencias significativas encontradas entre temperaturas de aclimatación (15°C > 20 °C), únicamente en los niveles de 11-KT de los machos (p < 0,05).

Además, en un estudio previo, García-López *et al.* (2008) encontraron una disminución en los niveles plasmáticos de E<sub>2</sub> y T, así como una proporción reducida de ovocitos vitelogénicos tardíos en hembras de *S. senegalensis* aclimatadas a una temperatura constante alta (18 °C), evidenciando el efecto perjudicial de las altas temperaturas en la reproducción de esta especie. Por otra parte, la ausencia de cambios en los niveles de esteroides sexuales en los ejemplares de *S. senegalensis* debido a la exposición a los fármacos (Tabla 3.8), tanto al IB como a la CBZ, es indicativa de la falta de alteración endocrina en las condiciones experimentales ensayadas. Varios estudios han examinado los efectos que tiene una exposición a largo plazo al IB (David y Pancharatna, 2009; Ji *et al.* 2013) y a la CBZ (Galus *et al.* 2014, 2013) en la reproducción y el desarrollo del pez cebra (*D. rerio*), así como en la reproducción de la medaka (*Oryzias latipes*) tras una exposición a largo plazo al IB (Flippin *et al.* 2007; Han *et al.* 2010;), pero no tenemos conocimiento de ningún estudio previo que examine estos efectos en *S. senegalensis*. Hay que añadir que Morthorst *et al.* (2013) no encontró alteraciones en los niveles de esteroides plasmáticos (E<sub>2</sub> y 11-KT) en adultos de pez cebra tras 7 días de exposición a IB. En general, los resultados obtenidos en la presente Tesis apuntan a que la falta de respuestas en los niveles de esteroides sexuales a los fármacos se deba a un tiempo de exposición demasiado corto.

#### **4. Discusión General**



Respecto a la primera hipótesis general planteada en esta Tesis, se ha demostrado que la temperatura de aclimatación tiene un claro efecto sobre las enzimas responsables de la biotransformación de xenobióticos, tanto las del metabolismo de fase I, como las de fase II. La sobrecompensación encontrada en la actividad de la enzima EROD al cambio de temperatura del agua parece favorecer los mecanismos de resistencia a compuestos tóxicos a temperaturas bajas (Tabla 4.1). Estos resultados concuerdan con la conocida estrategia de compensación térmica en los enzimas de los animales ectotermos, consistente en un aumento en la síntesis de proteínas al disminuir la temperatura. Los enzimas responsables de la protección antioxidante determinados en la presente Tesis Doctoral mostraron un comportamiento contrario con la temperatura. Este hecho puede deberse a que la exposición a altas temperaturas favorece la producción de las ROS en los ectotermos, siendo necesario aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes para defenderse de los daños causados por el estrés oxidativo.

Tabla 4.1. Relación de enzimas de biotransformación que modificaron su actividad con el objetivo de compensar la aclimatación a la temperatura.

Efecto de la aclimatación a la temperatura		
Sobrecompensación	Compensación	Inducción
EROD branquias	EROD S10 hígado	CAT S10 hígado
EROD mic. hígado	CECOD mic. hígado	GR S10 hígado
	CbE mic. hígado	
	UDPGT mic. hígado	

Mic: fracción microsomal del hígado

En cuanto a la segunda hipótesis general planteada, los resultados obtenidos permiten aceptar dicha hipótesis en los siguientes términos:

A) Los efectos del IB y de la CBZ sobre las actividades de los enzimas de biotransformación, tanto de fase I como de fase II, se observaron en mayor medida en los peces aclimatados a la temperatura más baja. Este hecho pone de manifiesto la gran influencia de la temperatura sobre la toxicodinámica de ambos fármacos en especies ectotermas, y sobre los mecanismos de resistencia en dichas especies.

B) El mantenimiento de la homeostasis en los peces implica algunos mecanismos fisiológicos no totalmente equivalentes a los de los mamíferos, debido al medio en el que habitan y a su carácter ectotérmico, que pueden ser alterados por los fármacos. Así, la administración de IB y CBZ interfirió en la osmorregulación en *S. senegalensis*. Ambos fármacos produjeron un aumento en los niveles plasmáticos de solutos y desechos nitrogenados, así como un aumento en la actividad NKA en los órganos osmorreguladores, las branquias y el intestino. Además, los niveles de osmolalidad plasmática y de la actividad NKA del intestino estuvieron condicionados por la temperatura de aclimatación.

C) La CBZ produjo una alteración en los porcentajes de los ácidos grasos AA y EPA en las branquias, señalando un efecto de este fármaco sobre el metabolismo de los lípidos. Dado que la expresión del gen COX-2 no se vio afectada por ninguno de los dos fármacos, en el caso de la CBZ no se puede descartar que la alteración del metabolismo lipídico se deba a la inhibición de actividad de la enzima COX-2 descrita en mamíferos.

D) A pesar de las altas dosis de CBZ y IB administradas en este estudio, su nula influencia sobre los niveles de esteroides sexuales puede deberse a un tiempo de exposición a los fármacos demasiado corto. La respuesta observada en los niveles de 11-KT en los machos aclimatados a la temperatura más alta pone de manifiesto la interferencia que genera el incremento de la temperatura en la maduración sexual en *S. senegalensis*.

Independientemente de la importancia de la temperatura de aclimatación como factor modulador de las respuestas a los fármacos, algunos de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, ponen de manifiesto algunos efectos del IB (Tabla 4.2) y de la CBZ (Tabla 4.3) que no habían sido descritos previamente en otras especies de teleósteos, y tampoco en humanos.

Si bien las temperaturas de aclimatación seleccionadas para nuestro estudio están dentro del rango de temperatura fisiológica óptima para *S. senegalensis*, los resultados obtenidos mostraron la existencia de una clara interacción entre la temperatura de aclimatación y la exposición a los fármacos, evidenciada por las respuestas fisiológicas y bioquímicas consideradas. Este hecho pone de manifiesto la importancia de considerar la temperatura como un factor relevante en los estudios de contaminación y toxicología ambiental.

Tabla 4.2. Comparativa de las respuestas al ibuprofeno obtenidas de estudios llevados a cabo en peces y en humanos.

IBUPROFENO				
Alteraciones metabólicas en peces	Especies	Referencias	Alteraciones metabólicas en humanos	Referencias
Disrupción en los mecanismos de osmorregulación (↑ niveles de osmolalidad y amoniaco)	<i>S. senegalensis</i>	Presente Tesis	Disrupción en los mecanismos excretores debido a la Secreción inapropiada de la HAD (casos clínicos raros)	Jones 2007 Artom <i>et al.</i> 2013 Roche <i>et al.</i> 2013
Disrupción en los mecanismos de osmorregulación	<i>O. mykiss</i>	Gravel <i>et al.</i> 2009		
↑ triglicéridos en plasma	<i>S. senegalensis</i>	Presente Tesis	Metabolismo lipídico inusual debido a la conversión quirál	Avgerinos y Hutt, 1990 Evans 2001 Rainsford 2005
↑ glucosa en plasma	<i>C. mrigala</i>	Saravanan <i>et al.</i> 2012	Hipoglucemia debida a la inhibición de los canales de potasio sensibles al ATP	Li <i>et al.</i> 2007
↑ plasma ALT (GPT)	<i>C. mrigala</i>	Saravanan <i>et al.</i> 2012		
Alteraciones en los niveles de AST (GOT) en plasma	<i>C. mrigala</i>	Saravanan <i>et al.</i> 2012		
Cambios moleculares (ATPasas) relacionados con la osmorregulación	<i>Menidia beryllina</i>	Jeffries <i>et al.</i> 2015		
↑ actividad BFCOD (CYP3A4)	<i>S. senegalensis</i>	Presente Tesis	Metabolización del IB via CYP2C9/C8	Rainsford 2012
↓ actividad relacionada con CYP2K/2M	<i>C. carpio</i>	Thibaut <i>et al.</i> 2006		
↑ actividad EROD y MROD (CYP1A)	<i>O. mykiss</i>	Gomez <i>et al.</i> 2011		
↓ UDPGT actividad	<i>C. carpio</i>	Thibaut <i>et al.</i> 2006	↑ niveles UDPGT	Kepp <i>et al.</i> 1997
↑ actividad t-GPx	<i>D. rerio</i>	Bartoskova <i>et al.</i> 2013	↑ actividades GPx y GST	Bartoskova <i>et al.</i> 2013
Inducción del Receptor-X- de pregnano (síntesis de la CYP3A4)	<i>C. carpio</i>	Corcoran <i>et al.</i> 2012		
↑ niveles de HSP70 en hígado y branquias	<i>O. mykiss</i>	Gravel y Vijayan, 2007		
Alteraciones en los procesos hormonales y reproductivos	<i>O. latipes</i>	Flippin <i>et al.</i> 2007 Han <i>et al.</i> 2010		
Anomalías en el desarrollo y en los procesos reproductivos	<i>D. rerio</i>	David y Pancharatna, 2009 Ji <i>et al.</i> 2013	Anomalías en el desarrollo fetal	Ben Maamar <i>et al.</i> 2017

Tabla 4.3. Comparativa de las respuestas a la carbamazepina obtenidas en estudios llevados a cabo en peces y en humanos.

CARBAMAZEPINA				
Alteraciones metabólicas en peces	Especies	Referencias	Alteraciones metabólicas en humanos	Referencias
Disrupción en los mecanismos de osmorregulación (↑ niveles de osmolalidad y amoniaco)	<i>S. senegalensis</i>	Presente estudio	↓ Osmolalidad del plasma por efecto antidiurético (como la HAD)	www.drugs.com
Disfunción del sistema de transporte de iones (canales de Na <sup>+</sup> )	<i>O. mykiss</i>	Li <i>et al.</i> 2009	↓ Actividad de los canales de potasio sensibles al ATP	Zhou <i>et al.</i> 2014
↑ creatinina en plasma	<i>S. senegalensis</i>	Presente estudio	Disrupción en los mecanismos excretores debido a la Secreción inapropiada de la HAD	Jones 2007 Velasco Cano y Runkle de la Vega, 2010
			↑ triglicéridos en plasma	www.drugs.com
↓ actividades antioxidantes (CAT, GR and GPx) tras exposición aguda	<i>O. mykiss</i> <i>L. gibbosus</i>	Li <i>et al.</i> 2011 Brandão <i>et al.</i> 2013		
↓ actividad UDPGT	<i>S. senegalensis</i>	Presente estudio	Potente inductor de la actividad UDPGT	Riva <i>et al.</i> 1996
↑ niveles HSP70 en músculo	<i>S. senegalensis</i>	Presente estudio	La HSP70 confieren protección contra hipersensibilidad a la CBZ	Alfirevic <i>et al.</i> 2006
Anomalías en el desarrollo y en los procesos reproductivos	<i>D. rerio</i>	Galus <i>et al.</i> 2014 Galus <i>et al.</i> 2013	Alteración en los niveles hormonales	Svalheim <i>et al.</i> 2009
			Malformaciones fetales (espina bífida)	Källén 1994
			Alteraciones en la calidad y cantidad espermática	Isojärvi <i>et al.</i> 2004



## **5. Conclusiones**



1. La buena condición fisiológica de los ejemplares de *S. senegalensis* determinada mediante los parámetros biométricos, junto con los valores plasmáticos de osmolalidad, glucosa y lactato; así como los niveles hepáticos de LDH y musculares de HSP70, corroboran que ambas temperaturas de aclimatación (15 y 20 °C) están dentro del rango óptimo de la especie.
2. El proceso de aclimatación de *S. senegalensis* a la temperatura implica la variación de la actividad de algunas enzimas biotransformación (EROD, CECOD, CbE, UDPGT) como estrategia de compensación térmica.
3. El aumento de la actividad de los enzimas antioxidantes es indicativo de la activación del mecanismo de protección frente al estrés oxidativo causado por el incremento de la temperatura.
4. El incremento en los niveles de expresión de la isoforma  $\alpha 1a$  de la NKA con la temperatura podría responder a alteraciones en la permeabilidad de la membrana respecto a los iones.
5. La disminución de los niveles de 11-KT en machos confirma la importancia de la temperatura del agua en los procesos reproductivos de *S. senegalensis*.
6. La administración de IB y de CBZ interfiere en la osmorregulación y en la excreción de residuos nitrogenados en *S. senegalensis*.

7. La administración de IB provoca un aumento en la actividad NKA en las branquias y en el intestino. La temperatura de aclimatación condiciona dicha respuesta solo en el intestino.
8. El aumento en los niveles de triglicéridos libres en sangre causado por la administración de IB se ve modulado por la temperatura de aclimatación, siendo más acusado a la temperatura más alta.
9. La alteración en los porcentajes de AA y EPA en las branquias de los peces inyectados con CBZ indican un efecto sobre el metabolismo de los lípidos.
10. La temperatura de aclimatación modifica las respuestas de las enzimas de biotransformación frente a la administración del IB y de la CBZ.
11. Aunque las concentraciones y la vía de administración de los fármacos empleada no reflejan una exposición natural realista, los resultados obtenidos en los diferentes parámetros como: la osmolalidad y el amoniaco plasmáticos, las actividades NKA, BFCOD y UDPGT, o el perfil de ácidos grasos, podrían ser de utilidad en la elección de biomarcadores en futuros estudios de campo.
12. La aclimatación a la temperatura produce cambios fisiológicos y bioquímicos y modula la respuesta a la administración de IB y CBZ en juveniles de *S. senegalensis*.

## **6. Bibliografia**



- Abraham, J. P., Baringer, M., Bindoff, N. L., Boyer, T., Cheng, L. J., Church, J. A. ... Willis, K. (2013). A review of global ocean temperature observations: Implications for ocean heat content estimates and climate change. *Rev Geophys*, 51, 450-483, doi:10.1002/rog.20022
- Abrahamson, A., Brandt, I., Brunstrom, B., Sundt, R. C., y Jorgensen, E. H. (2008). Monitoring contaminants from oil production at sea by measuring gill EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Environ Pollut*, 153, 169–175
- Alfirevic, A., Mills, T., Harrington, P., Pinel, T., Sherwood, J., Jawaid, A., Smith, J. C., March, R. E., Barratt, B. J., Chadwick, D. W., Kevin Park, B., y Pirmohamed, M. (2006). Serious carbamazepine-induced hypersensitivity reactions associated with the HSP70 gene cluster. *Pharmacogenet Genomic*, 16(4), 287–296
- Alpuche-Gual, L., y Gold-Bouchot, G. (2008). Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 71, 787-797. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.01.024
- Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., Maulvault, A. L., Tediosi, A., Fernández-Tejedor, M., Van den Heuvel, F., ... Barceló, D. (2015). Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environ Res*, 143, Part B, 56-64. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.09.018
- Álvarez-Muñoz, D., Huerta, B., Fernandez-Tejedor, M., Rodríguez-Mozaz, S., y Barceló, D. (2014). Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves. *Talanta*, 136, 174-182. doi:10.1016/j.talanta.2014.12.035
- Alygizakis, N. A., Gago-Ferrero, P., Borova, V. L., Pavlidou, A., Hatzianestis, I., y Thomaidis, N. S. (2016). Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *Sci Total Environ*, 541, 1097-1105. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.145

- Ambrósio, A. F., Soares-da-Silva, P., Carvalho, C. M., y Carvalho, A. P. (2002). Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochem Res*, 27(1-2), 121-130. doi:10.1023/A:1014814924965
- Amutha, C., y Subramanian, P. (2010). Effect of temperature, salinity, pH and naphthalene on ethoxyresorufin-O-deethylase activity of *Oreochromis mossambicus*. *Toxicol Environ Chem*, 92(1), 127-135, doi:10.1080/02772240903109092
- Andersson, T., y Förlin, L. (1992). Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquat Toxicol*, 24(1-2), 1-19. doi:10.1016/0166-445X(92)90014-E
- Andreu, V., Gimeno-García, E., Pascual, J. A., Vazquez-Roig, P., y Picó, Y. (2016). Presence of pharmaceuticals and heavy metals in the waters of a Mediterranean coastal wetland: Potential interactions and the influence of the environment. *Sci Total Environ*, 540, 278-286. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.007
- Arellano-Aguilar, O., Montero Montoya, R., y Macías García, C. (2009). Endogenous functions and expression of cytochrome P450 enzymes in teleost fish: a review. *Rev Fish Sci*, 17, 541–556
- Arjona, F. J., Vargas-Chacoff, L., Martín del Río, M. P., Flik, G., Mancera, J. M., y Klaren, P. H. M. (2011). Effects of cortisol and thyroid hormone on peripheral outer ring deiodination and osmoregulatory parameters in the Senegale sole (*Solea senegalensis*). *J Endocrinol*, 208, 323-330. doi:10.1530/JOE-10-0416
- Arjona, F. J., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., del Río, M. P. M., Flik, G., Mancera, J. M., y Klaren, P. H. M. (2010). Acclimation of *Solea senegalensis* to different ambient temperatures: Implications for thyroidal status and osmoregulation. *Mar Biol*, 157(6), 1325-1335. doi: 10.1007/s00227-010-1412-x
- Arjona, F. J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Gonçalves, O., Páscoa, I., Martín del Río, M. P., y Mancera, J. M. (2009). Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis*

- Kaup, 1858) to osmotic challenge: Implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture*, 287(3-4), 419-426
- Arjona, F. J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Martín del Río, M. P., y Mancera, J. M. (2007). Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 148(2), 413-421
- Armesto, P., Campinho, M. A., Rodríguez-Rúa, A., Cousin, X., Power, D. M., Manchado, M., y Infante, C. (2014). Molecular characterization and transcriptional regulation of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase a subunit isoforms during development and salinity challenge in a teleost fish, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comp Biochem Phys B*, 175(1), 23-38. doi: 10.1016/j.cbpb.2014.06.004
- Arnold, K. E., Brown, A. R., Brown, A. R., Ankley, G. T., y Sumpter, J. P. (2014). Medicating the environment: Assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. *Philos T Roy Soc B*, 369 (1656) doi:10.1098/rstb.2013.0569
- Artom, N., Oddo, S., Pende, A., Ottonello, L., Giusti, M., y Dallegrì, F. (2013). Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion and ibuprofen, a rare association to be considered: role of tolvaptan. *Case Reports in Endocrinology*. Vol. 2013, Article ID 818259, 4 pages. doi:10.1155/2013/818259
- Avgerinos, A., y Hutt, A. J. (1990). Interindividual variability in the enantiomeric disposition of ibuprofen following the oral administration of the racemic drug to healthy volunteers. *Chirality*, 2(4), 249-256. doi:10.1002/chir.530020410
- Babu, B. R., Venkatesan, P., Kanimozhi, R., y Basha, C. A. (2009). Removal of pharmaceuticals from wastewater by electrochemical oxidation using cylindrical flow reactor and optimization of treatment conditions. *J Environ Sci Heal A*, 44(10), 985-994. doi:10.1080/10934520902996880

- Balakrishna, K., Rath, A., Praveenkumarreddy, Y., Guruge, K. S., y Subedi, B. (2017). A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotox Environ Safe*, 137, 113-120. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.014>
- Balment, R. J., Warne, J. M., Tierney, M., y Hazon, N. (1993). Arginine vasotocin and fish osmoregulation. *Fish Physiol Biochem*, 11(1-6), 189-194. doi:10.1007/BF00004566
- Balsinde, J., Winstead, M. V., y Dennis, E. A. (2002). Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett*, 531(1), 2-6. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03413-0
- Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Zivna, D., Blahova, J., Marsalek, P., ... Faggio, C. (2013). Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuroendocrinol Lett*, 34(2), 102-108
- Beauvais, S. L., Cole, K. J., Atchison, G. J., y Coffey, M. (2002). Factors affecting brain cholinesterase activity in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Water Air Soil Pollut*, 135, 249–264
- Behera, S. K., Kim, H. W., Oh, J., y Park, H. (2011). Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci Total Environ*, 409(20), 4351-4360. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.015>
- Ben Maamar, M., Lesné, L., Hennig, K., Desdoits-Lethimonier, C., Kilcoyne, K. R., Coiffec, I., ... Jégou, B. (2017). Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. *Sci Rep*, 7:44184. doi:10.1038/srep44184
- Bertilsson, L. (1978). Clinical pharmacokinetics of carbamazepine. *Clin Pharmacokinet*, 3(2), 128-143. doi:10.2165/00003088-197803020-00003
- Blair, B., Nikolaus, A., Hedman, C., Klaper, R., y Grundl, T. (2015). Evaluating the degradation, sorption, and negative mass balances of pharmaceuticals and personal care products during

- wastewater treatment. *Chemosphere*, 134, 395-401.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.078>
- Blobaum, A. L., y Marnett, L. J. (2007). Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem*, 50(7), 1425-1441. doi:10.1021/jm0613166
- Boden, G. (2005). Free fatty acids and insulin secretion in humans. *Curr Diab Rep*, 5(3), 167-170
- Boix, C., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Parsons, J. R., Voogt, P. d., y Hernández, F. (2016). Biotransformation of pharmaceuticals in surface water and during waste water treatment: Identification and occurrence of transformation products. *J Hazard Mater*, 302, 175-187. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.053>
- Borsick, M., Rajkhowa, T., y Taub, M. (2006). Evidence for post-transcriptional regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase by prostaglandin E1. *Biochem Bioph Res Co*, 345(2), 739-745. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.158>
- Botte, E. S., Smith-Keune, C., Jerry, D. R. (2013). Temperature: a prolonged confounding factor on cholinesterase activity in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. *Aquat Toxicol*, 140, 337-339
- Boxall, A. B. A., Keller, V. D. J., Straub, J. O., Monteiro, S. C., Fussell, R., y Williams, R. J. (2014). Exploiting monitoring data in environmental exposure modelling and risk assessment of pharmaceuticals. *Environ Int*, 73, 176-185. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.018>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254
- Brandão, F. P., Rodrigues, S., Castro, B. B., Gonçalves, F., Antunes, S. C., y Nunes, B. (2013). Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: Biochemical and

- behavioral effects. *Aquat Toxicol*, 144-145, 218-229.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.005>
- Brozinski, J., Lahti, M., Oikari, A., y Kronberg, L. (2013). Identification and dose dependency of ibuprofen biliary metabolites in rainbow trout. *Chemosphere*, 93(9), 1789-1795.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.018>
- Bystriansky, J. S., y Schulte, P. M. (2011). Changes in gill H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase expression and activity during freshwater acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Biol*, 214, 2435-2442. doi: 10.1242/jeb.050633
- Carpenter, H. M., Fredrickson, L. S., Williams, D. E., Buhler, D. R., y Curtis, L. R. (1990). The effect of thermal-acclimation on the activity of arylhydrocarbon hydroxylase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Phys C*, 97:127-132
- Carrera-Lasfuentes, P., Aguilar-Palacio, I., Clemente Roldán, E., Malo Fumanal, S., y Rabanaque Hernandez, M. J. (2013). Medicine consumption in the adult population: Influence of self-medication. [Consumo de medicamentos en población adulta: influencia del autoconsumo] *Atencion Primaria*, 45(10), 528-535. doi:10.1016/j.aprim.2013.05.006
- Castro, C., Perez-Jimenez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., y Oliva-Teles, A. (2012). Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comp Biochem Phys A*, 163, 372-378
- Chen, H., Zha, J., Liang, X., Li, J., y Wang, Z. (2014). Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the asian clam *Corbicula fluminea*. *Aquat Toxicol*, 155, 1-8.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.001>
- Chen, C. H., y Lin, S. K. (2012). Carbamazepine treatment of bipolar disorder: a retrospective evaluation of naturalistic long-term outcomes. *BMC Psychiatry*, 23, 12-47.  
doi:10.1186/1471-244X-12-47

- Choe, K. P., Havird, J., Rose, R., Hyndman, K., Piermarini, P., y Evans, D. H. (2006). COX2 in a euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*: Primary sequence, distribution, localization, and potential function in gills during salinity acclimation. *J Exp Biol*, 209(9), 1696-1708.
- Christie, W. W. (1982). *Lipid Analysis*. Oxford, United Kindom. Pergamon Press
- Cincinelli, A., Martellini, T., Coppini, E., Fibbi, D., y Katsoyiannis, A. (2015). Nanotechnologies for removal of pharmaceuticals and personal care products from water and wastewater. a review. *J. Nanosci Nanotechnol*, 15(5), 3333-3347. doi:10.1166/jnn.2015.10036
- Clara, M., Strenn, B., y Kreuzinger, N. (2004). Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res*, 38(4), 947-954. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.058>
- Cohen-Luria, R., Rimon, G., y Moran, A. (1994). Cyclooxygenase inhibitors suppress inhibitory effect of PGE<sub>2</sub> on Na-K-ATPase in MDCK cells. *Am J Physiol-Renal*, 267, 94-98
- Collier, A. C., Tingle, M. D., Keelan, J. A., Paxton, J. W., y Mitchell, M. D. (2000). A highly sensitive fluorescent microplate method for the determination of UDP-glucuronosyl transferase activity in tissues and placental cell lines. *Drug Metab Dispos*, 28(10), 1184-1186
- Connors, K. A., Du, B., Fitzsimmons, P. N., Chambliss, C. K., Nichols, J. W., y Brooks, B. W. (2013). Enantiomer-specific in vitro biotransformation of select pharmaceuticals in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Chirality*, 25(11), 763-767. doi:10.1002/chir.22211
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., y Wiegand, C. (2011). Exposure to human pharmaceuticals carbamazepine, ibuprofen and bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquat Toxicol*, 105(3-4), 428-437. doi:10.1016/j.aquatox.2011.07.017

- Corcoran, J., Lange, A., Winter, M. J., y Tyler, C. R. (2012). Effects of pharmaceuticals on the expression of genes involved in detoxification in a carp primary hepatocyte model. *Environ Sci Technol*, 46(11), 6306–6314. doi:10.1021/es3005305
- Corcoran J, Winter MJ, Tyler CR (2010) Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit Rev Toxicol*, 40(4), 287-304. doi:10.3109/10408440903373590
- Costas, B., Aragao, C., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arjona, F. J., Mancera, J. M., Dinis, M. T., ... Conceição, L. E. C. (2012). Different environmental temperatures affect amino acid metabolism in the eurytherm teleost Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) as indicated by changes in plasma metabolites. *Amino Acids*, 43, 327–335
- Crane, M., Watts, C., y Boucard, T. (2006). Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci Total Environ*, 367(1), 23-41
- Daughton, C. G. (2016). Pharmaceuticals and the environment (PiE): Evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis. *Sci Total Environ*, 562, 391-426. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.03.109
- David, A., y Pancharatna, K. (2009). Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Phar*, 27(3), 390-395. doi:10.1016/j.etap.2009.01.002
- Decisión de Ejecución (UE) 2015/495 de la Comisión de 20 de marzo de 2015 por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo
- Deutsch, C., Emerson, S., y Thompson, L. (2005). Fingerprints of climate change in north pacific oxygen. *Geophys Res Lett*, 32(16), 1-4. doi:10.1029/2005GL023190

- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Referencia: DOUE-L-2013-81677
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Referencia: DOUE-L-2000-82524
- Directiva 98/15/CE de la Comisión de 27 de febrero de 1998 por la que se modifica la Directiva 91/271/CEE del Consejo en relación con determinados requisitos establecidos en su Anexo I
- Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Referencia: DOUE-L-1991-80646
- Durieux, E. D. H., Farver, T. B., Fitzgerald, P. S., Eder, K. J., y Ostrach, D. J. (2011). Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in young-of-year striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiol Biochem*, 37, 21–29
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., y Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88–95
- Epand, R. M. (1997). Membrane properties and the activation of protein kinase C and phospholipase A<sub>2</sub>. En R. Zidovetzki, (Comp.), *Lipid Polymorphism and Membrane Properties*. (pp. 225-285). Ontario, Canada, Academic Press. doi: 10.1016/S0070-2161(08)60211-7
- Evans, A. M. (2001). Comparative pharmacology of S(+)-ibuprofen and R(-)-ibuprofen. *Clin Rheumatol* 20(1):9–14. doi:10.1007/BF03342662
- Evans, D. H., y Gunderson, M. P. (1998). A prostaglandin, not NO, mediates endothelium-dependent dilation in ventral aorta of shark (*Squalus acanthias*). *AM J Physiol-Reg I*, 274(4), 43-44

- Feidantsis, K., Antonopoulou, E., Lazou, A., Portner, H. O., y Michaelidis, B. (2013). Seasonal variations of cellular stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Comp Physiol B*, 183, 625-639
- Feidantsis, K., Pörtner, H. O., Lazou, A., Kostoglou, B., y Michaelidis, B. (2009). Metabolic and molecular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata* during long-term exposure to increasing temperatures. *Mar Biol*, 156, 797-809
- Fenet, H., Mathieu, O., Mahjoub, O., Li, Z., Hillaire-Buys, D., Casellas, C., y Gomez, E. (2012). Carbamazepine, carbamazepine epoxide and dihydroxycarbamazepine sorption to soil and occurrence in a wastewater reuse site in Tunisia. *Chemosphere*, 88(1), 49-54. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.050>
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R. L., Pollio, A., y Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotox Environ Safe*, 55(3), 359-370. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00082-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00082-9)
- Fiess, J. C., Kunkel-Patterson, A., Mathias, L., Riley, L. G., Yancey, P. H., Hirano, T., y Grau, E. G. (2007). Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comp Biochem Phys A*, 146(2), 252-264. doi:10.1016/j.cbpa.2006.10.027
- Fiske, C. H., y Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol Chem*, 66, 375-400
- Fitzsimmons, P. N., Lien, G. J., y Nichols, J. W. (2007). A compilation of in vitro rate and affinity values for xenobiotic biotransformation in fish, measured under physiological conditions. *Comp Biochem Phys C*, 145, 485-506
- Flippin, J. L., Huggett, D., y Foran, C. M. (2007). Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat Toxicol*, 81(1), 73-78. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.002>

- Folch, J., Lees, M., y Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509
- Fonseca, V. F., Franca, S., Vasconcelos, R. P., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M. J., y Cabral, H. N. (2011a). Short-term variability of multiple biomarker response in fish from estuaries: influence of environmental dynamics. *Mar Environ Res*, 72, 172-178
- Fonseca, V. F., Franca, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M. J., y Cabral, H. N. (2011b). Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquat Toxicol*, 102, 216-227
- Franson, R. C., Eisen, D., Jesse, R., y Lanni, C. (1980). Inhibition of highly purified mammalian phospholipases A<sub>2</sub> by non-steroidal anti-inflammatory agents. Modulation by calcium ions. *Biochem J*, 186(2), 633-636
- Frölicher, T. L., Joos, F., Plattner, G., Steinacher, M., y Doney, S. C. (2009). Natural variability and anthropogenic trends in oceanic oxygen in a coupled carbon cycle-climate model ensemble. *Global Biogeochem Cy*, 23(1) doi:10.1029/2008GB003316
- Fujimori, C., Ogiwara, K., Hagiwara, A., Rajapakse, S., Kimura, A., y Takahashi, T. (2011). Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: Possible involvement in ovulation. *Mol Cell Endocrinol*, 332(1-2), 67-77. doi:10.1016/j.mce.2010.09.015
- Gadipelly, C., Pérez-González, A., Yadav, G. D., Ortiz, I., Ibáñez, R., Rathod, V. K., y Marathe, K. V. (2014). Pharmaceutical industry wastewater: Review of the technologies for water treatment and reuse. *Ind Eng Chem Res*, 53(29), 11571-11592. doi:10.1021/ie501210j
- Galus, M., Rangarajan, S., Lai, A., Shaya, L., Balshine, S., y Wilson, J. Y. (2014). Effects of chronic, parental pharmaceutical exposure on zebrafish (*Danio rerio*) offspring. *Aquat Toxicol*, 151, 124-134. doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.016

- Galus, M., Kirischian, N., Higgins, S., Purdy, J., Chow, J., Rangaranjan, S., ... Wilson, J. Y. (2013). Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquat Toxicol*, 132-133, 200-211. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.12.021
- García-López, Á., Sarasquete, C., y Martínez-Rodríguez, G. (2008). Temperature manipulation stimulates gonadal maturation and sex steroid production in Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup kept under two different light regimes. *Aquac Res*, 40(1), 103-111. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02069.x
- Gaspar, D., Lúcio, M., Wagner, K., Brezesinski, G., Rocha, S., Costa Lima, J. L. F., y Reis, S. (2010). A biophysical approach to phospholipase A<sub>2</sub> activity and inhibition by anti-inflammatory drugs. *Biophys Chem*, 152(1-3), 109-117. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2010.08.006>
- Ghelardoni, S., Tomita, Y. A., Bell, J. M., Rapoport, S. I., y Bosetti, F. (2004). Chronic carbamazepine selectively downregulates cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> expression and cyclooxygenase activity in rat brain. *Biol Psychiat*, 56(4), 248-254. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.05.012>
- Gomez, C. F., Constantine, L., Moen, M., Vaz, A., Wang, W., y Huggett, D. B. (2011). Ibuprofen metabolism in the liver and gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *B Environ Contam Tox*, 86(3), 247-251. doi:10.1007/s00128-011-0200-8
- Gomez, C. F., Constantine, L., y Huggett, D. B. (2010). The influence of gill and liver metabolism on the predicted bioconcentration of three pharmaceuticals in fish. *Chemosphere*, 81(10), 1189-1195. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.043
- Gómez, M. J., Martínez Bueno, M. J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A. R., y Agüera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66(6), 993-1002

- Gonçalves, C., Martins, M., Diniz, M. S., Costa, M. H., Caeiro, S., y Costa, P. M. (2014). May sediment contamination be xenoestrogenic to benthic fish? A case study with *Solea senegalensis*. *Mar Environ Res*, 99, 170-178. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.04.012>
- Gonçalves, C., Martins, M., Costa, M. H., Caeiro, S., y Costa, P. M. (2013). Ecological risk assessment of impacted estuarine areas: Integrating histological and biochemical endpoints in wild Senegalese sole. *Ecotox Environ Safe*, 95, 202-211. doi:<http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.004>
- Gonzalez, R. J. (2012). The physiology of hyper-salinity tolerance in teleost fish: A review. *J Comp Physiol B*, 182(3), 321-329. doi: 10.1007/s00360-011-0624-9
- Gravel, A., Wilson, J. M., Pedro, D. F. N., y Vijayan, M. M. (2009). Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. *Comp Biochem Phys C*, 149(4), 481-490. doi: 10.1016/j.cbpc.2008.11.002
- Gravel, A., y Vijayan, M. M. (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs disrupt the heat shock response in rainbow trout. *Aquat Toxicol*, 81(2), 197-206. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.12.001>
- Gros, M., Blum, K. M., Jernstedt, H., Renman, G., Rodríguez-Mozaz, S., Haglund, P., ... Ahrens, L. (2017). Screening and prioritization of micropollutants in wastewaters from on-site sewage treatment facilities. *J Hazard Mater*, 328, 37-45. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.12.055>
- Gros, M., Petrovic, M., Ginebreda, A., y Barceló, D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ Int*, 36(1), 15-26. doi:10.1016/j.envint.2009.09.002

- Grosell, M. (2006). Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation. *J Exp Biol*, 209, 2813-2827. doi: 10.1242/jeb.02345
- Grosser, T., Yusuff, S., Cheskis, E., Pack, M. A., y FitzGerald, G. A. (2002). Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. *P Natl Acad Sci Usa*, 99(12), 8418-8423. doi:10.1073/pnas.112217799
- Guzmán, J. M., Norberg, B., Ramos, J., Mylonas, C. C., y Mañanós, E. L. (2008). Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Gen Comp Endocr*, 156(2), 285-297. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.02.002
- Habig, W. H., Pabst, M. J., y Jakoby, W. B. (1974). Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249(22), 7130-7139
- Hamman, M. A., Thompson, G. A., y Hall, S. D. (1997). Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C. *Biochem Pharmacol*, 54(1), 33-41. doi:10.1016/S0006-2952(97)00143-3
- Hampel, M., Blasco, J., y Martín Díaz, M. L. (2016). Biomarkers and Effects. En Blasco, J., Chapman, P. M., Campana, O., y Hampel, M. (Eds.), *Marine Ecotoxicology* (p. 121-165). London, United Kingdom. Academic Press. ISBN: 978-0-12-803371-5
- Hampel, M., Bron, J. E., Taggart, J. B., y Leaver, M. J. (2014). The antidepressant drug Carbamazepine induces differential transcriptome expression in the brain of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquat Toxicol*, 151, 114-123. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.018
- Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., y Giesy, J. P. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat Toxicol*, 98(3), 256-264. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.02.013

- Hazel, J. R. (1984). Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am J Physiol-Reg I*, 246(4), 460-470
- Heberer, T. (2002a). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicol Lett*, 131(1-2), 5-17
- Heberer, T. (2002b). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J Hydrol*, 266(3-4), 175-189. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1694\(02\)00165-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1694(02)00165-8)
- Herrera, M., Aragão, C., Hachero, I., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Mancera, J. M., y Conceição, L. E. C. (2012). Physiological short-term response to sudden salinity change in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol Biochem*, 38(6), 1741-1751
- Hill, R. W., Wyse, G. A., y Anderson, M. (2006). *Fisiología animal*. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana. ISBN: 84-7903-990-6
- Hill, R. W., y Wyse, G. A. (1992). *Fisiología animal* (2ª ed.). Madrid, España. Ediciones Akal. ISBN: 84-460-0131-4
- Inslan AK, Foss A, Conceicao LEC, Dinis MT, Delbare D, Schram E, Kamstra A, Rema P, White P (2003) A review of the culture potential of *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Rev Fish Biol Fish*, 13, 379–407
- Inokuchi, M., Breves, J. P., Moriyama, S., Watanabe, S., Kaneko, T., Lerner, D. T., ... Seale, A. P. (2015). Prolactin 177, prolactin 188, and extracellular osmolality independently regulate the gene expression of ion transport effectors in gill of Mozambique tilapia. *Am J Physiol-Reg I*, 309(10), 1251-1263. doi: 10.1152/ajpregu.00168.2015
- Isojärvi, J. I., Löfgren, E., Juntunen, K. S., Pakarinen, A. J., Päivänsalo, M., Rautakorpi, I., y Tuomivaara, L. (2004). Effect of epilepsy and antiepileptic drugs on male reproductive health, *Neurology*. 62(2), 247-53

- Jamali, F., Singh, N. N., Pasutto, F. M., Russell, A. S., y Coutts, R. T. (1988). Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers in humans following oral administration of tablets with different absorption rates. *Pharmaceut Res*, 5(1), 40-43. doi:10.1023/A:1015811428066
- James, M. O., Stuchal, L. D., y Nyagode, B. A. (2008). Glucuronidation and sulfonation, in vitro, of the major endocrine-active metabolites of methoxychlor in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and induction following treatment with 3-methylcholanthrene. *Aquat Toxicol*, 86, 227-238. doi:10.1016/j.aquatox.2007.11.003
- Jeffries, K. M., Brander, S. M., Britton, M. T., Fanguie, N. A., y Connon, R. E. (2015). Chronic exposures to low and high concentrations of ibuprofen elicit different gene response patterns in a euryhaline fish. *Environ Sci Pollut Res*, 22(22), 17397–17413. doi:10.1007/s11356-015-4227-y
- Ji, K., Liu, X., Lee, S., Kang, S., Kho, Y., Giesy, J. P., y Choi, K. (2013). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *J Hazard Mater*, 254-255(1), 242-251. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.036
- Jones, H. S., Trollope, H. T., Hutchinson, T. H., Panter, G. H., y Chipman, J. K. (2012). Metabolism of ibuprofen in zebrafish larvae. *Xenobiotica*, 42(11), 1069-1075. doi:10.3109/00498254.2012.684410
- Jones, E. (2007). Drug-induced syndrome of inappropriate antidiuretic hormone. *Can Pharm J*, 140(6), 397-399. doi:10.3821/1913-701X(2007)140[397:DSOIAH]2.0.CO;2
- Jorgensen, E. H., y Wolkers, J. (1999). Effect of temperature on the P4501A response in winter- and summer-acclimated Arctic char (*Salvelinus alpinus*) after oral benzo a pyrene exposure. *Can J Fish Aquat Sci*, 56, 1370-1375
- Källén, A. J. (1994). Maternal carbamazepine and infant spina bifida. *Reprod Toxicol*, 8(3), 203-205

- Kepp, D. R., Sidelmann, U. G., y Hansen, S. H. (1997). Isolation and characterization of major phase I and II metabolites of ibuprofen. *Pharm Res*, 14(5), 676-680. doi:10.1023/A:1012125700497
- Kessler, R. (2010). Pharmaceutical factories as a source of drugs in water. *Environ Health Persp*, 118(9), A 383
- Klosterhaus, S. L., Grace, R., Hamilton, M. C., y Yee, D. (2013). Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environ Int*, 54, 92-99. doi:10.1016/j.envint.2013.01.009
- Koenig, S., Guillen, K., y Solé, M. (2013). Comparative xenobiotic metabolism capacities and pesticide sensitivity in adults of *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Comp Biochem Phys C*, 157, 329-336
- Koenig, S., y Solé, M. (2012). Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Mar Environ Res*, 79, 122-131. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.06.005
- K'oreje, K. O., Demeestere, K., De Wispelaere, P., Vergeynst, L., Dewulf, J., y Van Langenhove, H. (2012). From multi-residue screening to target analysis of pharmaceuticals in water: Development of a new approach based on magnetic sector mass spectrometry and application in the Nairobi river basin, Kenya. *Sci Total Environ*, 437, 153-164. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.052>
- Kroon, F. Streten, C., y Harries, S. (2017). A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PloS ONE*, 12(4), e0174762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174762>

- Kümmerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *J Environ Manage*, 90(8), 2354-2366. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023>
- Kyprianou, T. D., Pörtner, H., Anestis, A., Kostoglou, B., Feidantsis, K., y Michaelidis, B. (2010). Metabolic and molecular stress responses of gilthead sea bream *Sparus aurata* during exposure to low ambient temperature: an analysis of mechanisms underlying the winter syndrome. *J Comp Physiol B*, 180, 1005-1018
- Lange, U., Saborowski, R., Siebers, D., Buchholz, F., y Karbe, L. (1998). Temperature as a key factor determining the regional variability of the xenobiotic-inducible ethoxyresorufin-O-deethylase activity in the liver of dab (*Limanda limanda*). *Can J Fish Aquat Sci*, 55, 328-338
- Lee, W. H., Kim, K., Kim, M. G., y Lee, S. B. (1995). Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: effects of organic cosolvents and temperature. *J Ferment Bioeng*, 80(6), 613-615. doi:10.1016/0922-338X(96)87742-7
- Ley 10/2013, Boletín Oficial del Estado, Núm. 117, de 25 de julio de 2013, páginas 54488 a 54529. Referencia: BOE-A-2013-8083
- Li, Z., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., ... Randak, T. (2011). Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotox Environ Safe*, 74(3), 319-327. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.008>
- Li, Z., Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., y Randak, T. (2010a). Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. *Chem-Biol Interact*, 183(1), 98-104. doi:10.1016/j.cbi.2009.09.009
- Li, Z., Zlabek, V., Grabic, R., Velisek, J., MacHova, J., y Randak, T. (2010b). Enzymatic alterations and RNA/DNA ratio in intestine of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, induced

- by chronic exposure to carbamazepine. *Ecotoxicology*, 19(5), 872-878. doi:10.1007/s10646-010-0468-1
- Li, Z., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., y Randak, T. (2009). Responses of antioxidant status and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, chronically treated with carbamazepine. *Chemosphere*, 77(11), 1476-1481. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.031>
- Li, J., Zhang, N., Ye, B., Ju, W., Orser, B., Fox, J. E. M., y Lu, W. (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs increase insulin release from beta cells by inhibiting ATP-sensitive potassium channels. *Br J Pharmacol*, 151(4), 483-493. doi:10.1038/sj.bjp.0707259
- Librán-Pérez, M., Figueiredo-Silva, A. C., Panserat, S., Geurden, I., Míguez, J. M., Polakof, S., y Soengas, J. L. (2013). Response of hepatic lipid and glucose metabolism to a mixture or single fatty acids: possible presence of fatty acid-sensing mechanisms. *Comp Biochem Phys A*, 164(1), 241-248
- Lister, A. L., y Van Der Kraak, G. (2008). An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. *General and Comparative Endocrinology*, 159(1), 46-57. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.07.017>
- López-Rodríguez, R., Novalbos, J., Gallego-Sandín, S., Román-Martínez, M., Torrado, J., Gisbert, J. P., y Abad-Santos, F. (2008). Influence of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of racemic and enantiomeric forms of ibuprofen in healthy volunteers. *Pharm Res*, 58(1), 77-84. doi:10.1016/j.phrs.2008.07.004
- Lushchak, V. I., y Bagnyukova, T. V. (2006). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comp Biochem Phys C*, 143(1), 30-35. doi:10.1016/j.cbpc.2005.11.017
- Lyons, M. C., Wong, D. K. H., Mulder, I., Lee, K., y Burrige, L. E. (2011). The influence of water temperature on induced liver EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed

- to crude oil and oil dispersants. *Ecotox Environ Safe*, 74(4), 904-910. doi:<http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.013>
- Lyssimachou, A., Thibaut, R., Gisbert, E., y Porte, C. (2014). Gemfibrozil modulates cytochrome P450 and peroxisome proliferation-inducible enzymes in the liver of the yellow European eel (*Anguilla anguilla*). *Environ Sci Pollut Res*, 21, 862-871. doi:10.1007/s11356-013-1944-y
- Madikizela, L. M., Tavengwa, N. T., Chimuka, L. (2017). Status of pharmaceuticals in African water bodies: Occurrence, removal and analytical methods. *J Environ Manage*, 193, 211-220. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.022>
- Maranho, L. A., Baena-Nogueras, R. M., Lara-Martín, P. A., Del Valls, T. A., y Martín-Díaz, M. L. (2014). Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species. *Environ Res*, 134, 353-365. doi:10.1016/j.envres.2014.08.014
- Martínez Bueno, M. J., Boillot, C., Fenet, H., Chiron, S., Casellas, C., y Gómez, E. (2013). Fast and easy extraction combined with high resolution-mass spectrometry for residue analysis of two anticonvulsants and their transformation products in marine mussels. *J Chromatogr A*, 1305, 27-34. doi:10.1016/j.chroma.2013.06.071
- Mastropaolo, W., y Yourno, J. (1981). An ultraviolet spectrophotometric assay for alpha-naphthyl acetate and alpha-naphthyl butyrate esterases. *Anal Biochem*, 115, 188-193
- McCormick, S. D. (2001). Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Am Zool*, 41, 781-794. doi:10.1093/icb/41.4.781
- McCormick, S. D. (1993). Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity. *Can J Fish Aquat Sci*, 50, 656-658
- Mearns, A. J., Reish, D. J., Oshida, P. S., Morrison, A. M., Rempel-Hester, M. A., Arthur, C., ... Pryor, R. (2016). Effects of pollution on marine organisms. *Water Environ Res*, 88(10), 1693-1807. doi:10.2175/106143016X14696400495695

- Mezzelani, M., Gorbi, S., Da Ros, Z., Fattorini, D., d'Errico, G., Milan, M., ... Regoli, F. (2016). Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res*, 121, 31-39. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.03.005>
- Migaud, H., Davie, A., y Taylor, J. F. (2010). Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *J Fish Biol*, 76(1), 27-68. doi:[10.1111/j.1095-8649.2009.02500.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02500.x)
- Momenbeik, F., y Riahi, F. T. (2014). Chemically modified eggshell membrane as an adsorbent for solid-phase-extraction of morphine followed by high performance liquid chromatography analysis. *Anal Bioanal Chem Res*, 1(2), 108-116. doi:[10.22036/abcr.2014.7310](http://dx.doi.org/10.22036/abcr.2014.7310)
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Huerta, B., Barceló, D., y León, V. M. (2016). Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon? *Environ Res*, 146, 282-298. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.001>
- Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Gros, M., Barceló, D., y León, V. M. (2015). Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a Mediterranean coastal lagoon (SE Spain). *Environ Res*, 138, 326-344. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.016>
- Morthorst, J. E., Lister, A., Bjerregaard, P., y Der Kraak, G. V. (2013). Ibuprofen reduces zebrafish PGE2 levels but steroid hormone levels and reproductive parameters are not affected. *Comp Biochem Phys C*, 157(2), 251-257. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.12.001>
- Nikoskelainen, S., Bylund, G., y Lilius, E. (2004). Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Dev Comp Immunol*, 28(6), 581-592. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.10.003>

- Norambuena, F., Mackenzie, S., Bell, J. G., Callol, A., Estévez, A., y Duncan, N. (2012). Prostaglandin (F and E, 2- and 3-series) production and cyclooxygenase (COX-2) gene expression of wild and cultured brood stock of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Gen Comp Endocr*, 177(2), 256-262. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.04.009
- Noyes, P. D., McElwee, M. K., Miller, H. D., Clark, B. W., Van Tiem, L. A., Walcott, K. C., Erwin, K. N., Levin, E. D. (2009). The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environ Int*, 35, 971-986. doi:10.1016/j.envint.2009.02.006
- Oliva, M., Gravato, C., Guilhermino, L., Galindo-Riaño, M. D., y Perales, J. A. (2014). EROD activity and cytochrome P4501A induction in liver and gills of Senegal sole *Solea senegalensis* from a polluted Huelva estuary (SW Spain). *Comp Biochem Phys C*, 166, 134-144. doi:10.1016/j.cbpc.2014.07.010
- Oliva, M., de Canales, M. L. G., Gravato, C., Guilhermino, L., y Perales, J. A. (2010). Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Senegal sole (*Solea senegalensis*) from a Huelva estuary (SW Spain). *Ecotoxicol Environ Saf*, 73, 1842-1851
- Oliveira, C., Mañanós, E., Ramos, J., y Sánchez-Vázquez, F. J. (2011). Impact of photoperiod manipulation on day/night changes in melatonin, sex steroids and vitellogenin plasma levels and spawning rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Comp Biochem Phys A*, 159(3), 291-295. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.03.025
- Olsvik, P. A., Vikesa, V., Lie, K. K., y Hevroy, E. M. (2013). Transcriptional responses to temperature and low oxygen stress in Atlantic salmon studied with next-generation sequencing technology. *BMC Genomics*, 14(1), 817. doi: 10.1186/1471-2164-14-817
- Pankhurst, N. W., y Munday, P. L. (2011). Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Mar Freshwater Res*, 62(9), 1015-1026. doi:10.1071/MF10269
- Patrignani, P., y Patrono, C. (2015). Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *BBA-MOL Cell Biol L*, 1851(4), 422-432. doi:10.1016/j.bbalip.2014.09.016

- Pirkmajer, S., y Chibalin, A. V. (2016). Na, K-ATPase regulation in skeletal muscle. *AM J Physiol-Endoc M*, 311(1), 1-31. doi: 10.1152/ajpendo.00539.2015
- Pörtner, H. O. (2002) Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp Biochem Phys A*, 132, 739-761
- Precht, H., Christophersen, J., Hensel, H., Larcher, W. (1973). *Temperature and Life*. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin. ISBN 978-3-642-65708-5
- Rainsford, K. D. (2012). *Ibuprofen: pharmacology, therapeutics and side effects*. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. ISBN: 978-3-0348-0495-0. doi:10.1007/978-3-0348-0496-7
- Rainsford, K. D. (2005). *Ibuprofen: a critical bibliographic review*. London, UK. Taylor y Francis. ISBN: 0-203-37518-1
- Ramirez, A. J., Mottaleb, M. A., Brooks, B. W., y Chambliss, C. K. (2007). Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 79(8), 3155-3163. doi:10.1021/ac062215i
- Rapoport, S. I. (2014). Lithium and the other mood stabilizers effective in bipolar disorder target the rat brain arachidonic acid cascade. *ACS Chem Neurosci*, 5(6), 459-467. doi: 10.1021/cn500058v
- Rapoport, S. I. (2008). Brain arachidonic and docosahexaenoic acid cascades are selectively altered by drugs, diet and disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 79(3-5), 153-156. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2008.09.010>
- Rapoport, S. I., y Bosetti, F. (2002). Do lithium and anticonvulsants target the brain arachidonic acid cascade in bipolar disorder? *Arch Gen Psychiat*, 59(7), 592-596. doi: 10.1001/archpsyc.59.7.592

- Regoli, F., y Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar Environ Res*, 93, 106-117
- Rimoldi, L., Meroni, D., Falletta, E., Pifferi, V., Falciola, L., Cappelletti, G., y Ardizzone, S. (2017). Emerging pollutant mixture mineralization by TiO<sub>2</sub> photocatalysts. The role of the water medium. *Photochem Photobiol Sci*, 16(1), 60-66. doi:10.1039/c6pp00214e
- Riva, R., Albani, F., Contin, M., y Baruzzi, A. (1996). Pharmacokinetic interactions between antiepileptic drugs. Clinical considerations. *Clin Pharmacokinet*, 31(6), 470-493
- Roche, C., Ragot, C., Moalic, J. L., Simon, F. y Oliver, M. (2013). Ibuprofen can induce syndrome of inappropriate diuresis in healthy young patients. *Case Reports in Medicine*, Vol. 2013, Article ID 167267, 4 pages. doi:10.1155/2013/167267
- Rudy, A. C., Knight, P. M., Brater, D. C., y Hall, S. D. (1991). Stereoselective metabolism of ibuprofen in humans: Administration of R-, S- and racemic ibuprofen. *J Pharmacol Exp Ther*, 259(3), 1133-1139
- Sabatés, A., Martin, P., Lloret, J., y Raya, V. (2006). Sea warming and fish distribution: the case of the small pelagic fish, *Sardinella aurita*, in the western Mediterranean. *Glob Chang Biol*, 12, 2209-2219
- Salat, J., y Pascual, J. (2002). The oceanographic and meteorological station at l'Estartit (NW Mediterranean). In: *Tracking long-term hydrological change in the Mediterranean Sea*. CIESM Workshop Series, 16, 29-32. Monaco
- Sánchez-Nogué, B., Varó, I., y Solé, M. (2013). Comparative analysis of selected biomarkers and pesticide sensitivity in juveniles of *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Environ Sci Pollut Res*, 20(5), 3480-3488. doi:10.1007/s11356-012-1355-5
- Sánchez-Polo, M., López-Peñalver, J., Prados-Joya, G., Ferro-García, M. A., y Rivera-Utrilla, J. (2009). Gamma irradiation of pharmaceutical compounds, nitroimidazoles, as a new

- alternative for water treatment. *Water Res*, 43(16), 4028-4036. doi:10.1016/j.watres.2009.05.033
- Santos, J. L., Aparicio, I., Callejón, M., y Alonso, E. (2009). Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *J Hazard Mater*, 164(2-3), 1509-1516. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.073
- Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., y Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater*, 175(1-3), 45-95. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100
- Saravanan, M., Devi, K. U., Malarvizhi, A., y Ramesh, M. (2012). Effects of ibuprofen on hematological, biochemical and enzymological parameters of blood in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 34(1), 14-22. doi:10.1016/j.etap.2012.02.005
- Sauvé, S., y Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chem Cent J*, 8, 15-21. doi:10.1186/1752-153X-8-15
- Singh, N., Jabeen, T., Somvanshi, R. K., Sharma, S., Dey, S., y Singh, T. P. (2004). Phospholipase A<sub>2</sub> as a target protein for nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Crystal structure of the complex formed between phospholipase A<sub>2</sub> and oxyphenbutazone at 1.6 Å resolution. *Biochemistry*, 43(46), 14577-14583. doi: 10.1021/bi0483561
- Siscar, R., Varó, I., y Solé, M. (2015). Hepatic and branchial xenobiotic biomarker responses in *Solea* spp. from several NW Mediterranean fishing grounds. *Mar Environ Res*, 112, 35-43. doi:10.1016/j.marenvres.2015.09.001
- Sleiderink, H. M., Beyer, J., Scholtens, E., Goksoyr, A., Nieuwenhuize, J., Vanliere, J. M., Everaarts, J. M., y Boon, J. P. (1995). Influence of temperature and polyaromatic

- contaminants on CYP1A levels in northsea dab (*Limanda limanda*). *Aquat Toxicol*, 32, 189-209
- Smarandache, A., Militaru, A., Goker, H., Pascu, A., y Pascu, M. (2012). Laser methods for pharmaceutical pollutants removal. *Proc SPIE - Int Soc Opt Eng*, 8411. doi:10.1117/12.966414
- Smith, E. M., y Wilson, J. Y. (2010). Assessment of cytochrome P450 fluorometric substrates with rainbow trout and killifish exposed to dexamethasone, pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile, rifampicin, and  $\beta$ -naphthoflavone. *Aquat Toxicol*, 97(4), 324-333. doi:10.1016/j.aquatox.2010.01.005
- Smith, W. L. (1989). The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J*, 259(2), 315-324
- Smith, M. W. (1967). Influence of temperature acclimatization on the temperature-dependence and ouabain-sensitivity of goldfish intestinal adenosine triphosphatase. *Biochem J*, 105, 65-71
- Solé, M., Fortuny, A., y Mañanós, E. (2014). Effects of selected xenobiotics on hepatic and plasmatic biomarkers in juveniles of *Solea senegalensis*. *Environ Res*, 135, 227-235. doi:10.1016/j.envres.2014.09.024
- Solé, M., Manzanera, M., Bartolomé, A., Tort, L., y Caixach, J. (2013). Persistent organic pollutants (POPs) in sediments from fishing grounds in the NW Mediterranean: Ecotoxicological implications for the benthic fish *Solea* sp. *Mar Pollut Bull*, 67(1-2), 158-165. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.11.018
- Solé, M., Vega, S., y Varó, I. (2012). Characterization of type "B" esterases and hepatic CYP450 isoenzymes in Senegalese sole for their further application in monitoring studies. *Ecotoxicol Environ Saf*, 78, 72-79

- Solé, M., Baena, M., Arnau, S., Carrasson, M., Maynou, F., y Cartes, J. E. (2010). Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables. *Environ Intern*, 36, 202–211. doi:10.1016/j.envint.2009.11.008
- Solé, M., García de la Parra, L. M., Alejandre-Grimaldo, S., y Sardá, F. (2006). Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshore commercial species of the NW Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull*, 52, 1708-1716. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.07.015
- Sole, M., y Livingstone, D. R. (2005). Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and ‘NADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase’ activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comp Biochem Phys C*, 141, 20-31
- Sorensen, P. W., y Goetz, F. W. (1993). Pheromonal and reproductive function of F prostaglandins and their metabolites in teleost fish. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 6(1-3), 385-393
- Stauber, J. L., Chariton, A. y Apte, S. (2016). Global Change. En Blasco, J., Chapman, P. M., Campana, O., y Hampel, M. (Eds.), *Marine Ecotoxicology* (p. 121-165). London, United Kingdom. Academic Press. ISBN: 978-0-12-803371-5
- Suwalsky, M., Mennickent, S., Norris, B., y Cardenas, H. (2006). The antiepileptic drug carbamazepine affects sodium transport in toad epithelium. *Toxicol in Vitro*, 20(6), 891-898. doi:10.1016/j.tiv.2006.01.010
- Svalheim, S., Taubøll, E., Luef, G., Lossius, A., Rauchenzauner, M., Sandvand, F., . . . Gjerstad, L. (2009). Differential effects of levetiracetam, carbamazepine, and lamotrigine on reproductive endocrine function in adults. *Epilepsy Behav*, 16(2), 281-287. doi:10.1016/j.yebeh.2009.07.033
- Tan, S. C., Patel, B. K., Jackson, S. H. D., Swift, C. G., y Hutt, A. J. (2002). Stereoselectivity of ibuprofen metabolism and pharmacokinetics following the administration of the racemate to healthy volunteers. *Xenobiotica*, 32(8), 683-697. doi:10.1080/00498250210142994

- Tanoue, R., Nomiya, K., Nakamura, H., Hayashi, T., Kim, J. -, Isobe, T., . . . Tanabe, S. (2014). Simultaneous determination of polar pharmaceuticals and personal care products in biological organs and tissues. *J Chromatogr A*, 1355, 193-205. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.016
- Tate, S. K., Depondt, C., Sisodiya, S. M., Cavalleri, G. L., Schorge, S., Soranzo, N., ... Goldstein, D. B. (2005). Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *P Natl Acad Sci USA*, 102(15), 5507-5512. doi:10.1073/pnas.0407346102
- Thibaut, R., Schnell, S., y Porte, C. (2006). The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: An in-vitro study. *Environ Sci Technol*, 40(16), 5154-5460. doi:10.1021/es0607483
- Thomas, P. M., y Foster, G. D. (2004). Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, caffeine, and triclosan in wastewater by gas chromatography-mass spectrometry. *J Environ Sci Heal A*, 39(8), 1969-1978
- Thorn, C. F., Leckband, S. G., Kelsoe, J., Steven Leeder, J., Müller, D. J., Klein, T. E., y Altman, R. B. (2011). PharmGKB summary: Carbamazepine pathway. *Pharmacogenet Genomics*, 21(12), 906-910. doi:10.1097/FPC.0b013e328348c6f2
- Uno, T., Ishizuka, M., y Itakura, T. (2012). Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environ Toxicol Phar*, 34(1):1-13. doi:10.1016/j.etap.2012.02.004
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*. 13, 57-149
- Van Praag, D., Farber, S. J., Minkin, E., y Primor, N. (1987). Production of eicosanoids by the killifish gills and opercular epithelia and their effect on active transport of ions. *Gen Comp Endocrinol*, 67(1), 50-7

- Vandermeersch, G., Lourenço, H. M., Álvarez-Muñoz, D., Cunha, S., Diogène, J., Cano-Sancho, G., ... Robbens, J. (2015). Environmental contaminants of emerging concern in seafood – European database on contaminant levels. *Environ Res*, 143, Part B, 29-45. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.011>
- Varó, I., Navarro, J. C., Rigos, G., Del Ramo, J., Alvar Caldach-Giner, J., Hernández, A., ... Torreblanca, A. (2013). Proteomic evaluation of potentiated sulfa treatment on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) liver. *Aquaculture*, 376-379, 36-44. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.012>
- Varó, I., Nunes, B., Amat, F., Torreblanca, A., Guilhermino, L., y Navarro, J. C. (2007). Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings. *Aquat Living Resour*, 20(3), 263-270. doi:10.1051/alr:2007039
- Varó, I., Navarro, J. C., Amat, F., y Guilhermino, L. (2003). Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pestic Biochem Phys*, 75, 61–72
- Vassault, A. (1983). Lactate dehydrogenase. En M. O. Bergmeyer, (Ed.), *Methods of enzymatic analysis, enzymes: oxidoreductases, transferases* (pp. 118-126). Academic Press, New York
- Vazquez-Roig, P., Andreu, V., Onghena, M., Blasco, C., y Picó, Y. (2011). Assessment of the occurrence and distribution of pharmaceuticals in a Mediterranean wetland (L'Albufera, Valencia, Spain) by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, 400(5), 1287-1301. doi:10.1007/s00216-011-4826-5
- Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E. L., y Parrinello, N. (2002). Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture*, 210(1-4), 231-243. doi:[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00818-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00818-3)
- Velasco Cano, M. V., Runkle de la Vega, I. (2010). Aspectos actuales del síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética/síndrome de antidiuresis inadecuada. *Endocrinología y Nutrición*, 57(2):22–29

- Vernouillet, G., Eullaffroy, P., Lajeunesse, A., Blaise, C., Gagné, F., y Juneau, P. (2010). Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. *Chemosphere*, 80(9), 1062-1068. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.05.010
- Viciano, E., Monroig, Ó., Barata, C., Peña, C., y Navarro, J. C. (2015). Antioxidant activity and lipid peroxidation in *Artemia nauplii* enriched with DHA-rich oil emulsion and the effect of adding an external antioxidant based on hydroxytyrosol. *Aquac Res*, n/a-n/a. doi: <https://doi.org/10.1111/are.12943>
- Vinagre, C., Narciso, L., Pimentel, M., Cabral, H. N., Costa, M. J., y Rosa, R. (2013). Contrasting impacts of climate change across seasons: effects on flatfish cohorts. *Reg Environ Change*, 13, 853-859
- Waskell, L., y Kim, J. J. P. (2015). Electron Transfer Partners of Cytochrome P450. En P. R., Ortiz de Montellano (Ed.), *Cytochrome P450* (p. 33-68). Switzerland, Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-12108-6\_2
- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., y Hühnerfuss, H. (2004). Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56(6), 583-592. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.015
- Wheelock, C. E., Phillips, B. M., Anderson, B. S., Miller, J. L., Miller, M. J., y Hammock, B. D. (2008). Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Rev Environ Contam Toxicol*, 195, 117-178
- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., y Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol*, 30(4), 347-570.

- Willmer, P., Stone, G., y Johnston, I. (2000). Environmental philosophy of animals. Oxford UK, Wiley-Blackwell. ISBN 0-632-03517-X
- Withers, P. C. (1992). Comparative Animal Physiology (1<sup>st</sup> Ed.). Orlando FL EEUU, Saunders College Publishing. ISBN 0-03-012847-1
- Wood, C. M., McDonald, D. G. (1997). Temperature effects on the reproductive performance of fish. En G. Van Der Kraak, y N. W. Pankhurst (Comp.), *Global warming: implications for freshwater and marine fish* (pp. 159-176). Cambridge UK, Cambridge University Press
- Yan, Q., Zhang, Y.-X., Kang, J., Gan, X.-M., Xu-Y, P., Guo, J.-S., y Gao, X. (2014). A Preliminary study on the occurrence of pharmaceutically active compounds in the river basins and their removal in two conventional drinking water treatment plants in Chongqing, China. *Clean*, 43(6), 794-803. doi:10.1002/clen.201400039
- Yu, Y., y Wu, L. (2015). Determination and occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in fish (*Morone saxatilis*). *Front Environ Sci En*, 9(3), 475–481 doi:10.1007/s11783-014-0640-6
- Yuen, A. W. C., Sander, J. W., Flugel, D., Patsalos, P. N., Browning, L., Bell, G. S., y Koepp, M. M. (2008). Erythrocyte and plasma fatty acid profiles in patients with epilepsy: Does carbamazepine affect omega-3 fatty acid concentrations? *Epilepsy Behav*, 12(2), 317-323. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2007.10.015>
- Zenetos, A., Gofas, S., Morri, C., Rosso, A., et al. (2012). Alien species in the Mediterranean Sea by 2012. A contribution to the application of European Union's Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Part 2. Introduction trends and pathways. *Mediterr Mar Sci*, 13, 328-352
- Zenker, A., Cicero, M. R., Prestinaci, F., Bottoni, P., y Carere, M. (2014). Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J Environ Manage*, 133, 378-387. doi:10.1016/j.jenvman.2013.12.017

Zhou, Q., Chen, P., Devaraneni, P. K., Martin, G. M., Olson, E. M., y Shyng, S. (2014). Carbamazepine inhibits ATP-sensitive potassium channel activity by disrupting channel response to MgADP. *Channels*, 8(4), 376-382. doi:10.4161/chan.29117

Zupanc, M., Kosjek, T., Petkovšek, M., Dular, M., Kompare, B., Širok, B., ... Heath, E. (2013). Removal of pharmaceuticals from wastewater by biological processes, Hydrodynamic cavitation and UV treatment. *Ultrason Sonochem*, 20(4), 1104-1112. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.003

[http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015\\_8-May-15.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf) 19th WHO Model List of Essential Medicines, April 2015. Última vez consultado el 17.03.2017

<https://www.eea.europa.eu/themes/water/wise-help-centre/glossary-definitions/pollution> European Environment Agency. Última vez consultado el 03.05.2017

[https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR\\_AR5\\_FINAL\\_full\\_es.pdf](https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full_es.pdf) V Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, IPCC (2014). Última vez consultado el 16.02.2017

<http://www.ictieterm.es> Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Andalucía. Última vez consultado el 22.11.2016

<http://www.drugs.com/carbamazepine.html> Última vez consultado el 08.05.2017