



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIENCIAS DE LA VIDA Y LA NATURALEZA  
(ILACVN)

**BIOTECNOLOGIA**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN DEL MEDICAMENTO  
ETINILESTRADIOL + LEVONORGESTREL METABOLIZADO POR  
MICROORGANISMOS TOLERANTES EN *Caenorhabditis elegans* COMO  
MODELO BIOLÓGICO**

**ALBA TERESA AGUILERA SILVA**

Foz do Iguaçu  
2022



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIENCIAS DE  
LA VIDA Y LA NATURALEZA (ILACVN)

**BIOTECNOLOGIA**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN DEL MEDICAMENTO  
ETINILESTRADIOL + LEVONORGESTREL METABOLIZADO POR  
MICROORGANISMOS TOLERANTES EN *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO  
BIOLÓGICO**

**ALBA TERESA AGUILERA SILVA**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza de la Universidad Federal de Integración Latino-Americana, como requisito parcial a la obtención del título de Grado en Biotecnología.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Leticia Priscilla Arantes  
Coorientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano

Foz do Iguaçu  
2022

ALBA TERESA AGUILERA SILVA

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN DEL MEDICAMENTO ETINILESTRADIOL + LEVONORGESTREL METABOLIZADO POR MICROORGANISMOS TOLERANTES EN *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO BIOLÓGICO**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza de la Universidad Federal de Integración Latino-Americana, como requisito parcial a la obtención del título de Grado en Biotecnología.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Leticia Priscilla Arantes  
Coorientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Priscilla Arantes  
UNILA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Caroline da Costa Silva Gonçalves  
UNILA

---

Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz  
UNILA

Foz do Iguaçu: 8 de diciembre de 2022.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

**Nome completo do autor(a):** Alba Teresa Aguilera Silva

**Curso:** Biotecnologia

	<b>Tipo de Documento</b>
<input checked="" type="checkbox"/> <b>graduação</b>	<input type="checkbox"/> <b>artigo</b>
<input type="checkbox"/> <b>especialização</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>trabalho de conclusão de curso</b>
<input type="checkbox"/> <b>mestrado</b>	<input type="checkbox"/> <b>monografia</b>
<input type="checkbox"/> <b>doutorado</b>	<input type="checkbox"/> <b>dissertação</b>
	<input type="checkbox"/> <b>tese</b>
	<input type="checkbox"/> <b>CD/DVD – obras audiovisuais</b>
	<input type="checkbox"/> <b>(.....)</b>

**Título do trabalho acadêmico:** EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN DEL MEDICAMENTO ETINILESTRADIOL + LEVONORGESTREL METABOLIZADO POR MICROORGANISMOS TOLERANTES EN *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO BIOLÓGICO

**Nome do orientador(a):** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Leticia Priscilla Arantes

**Data da Defesa:** 08/12/2022

### **Licença não-exclusiva de Distribuição**

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* Licença 3.0 Unported.

Foz do Iguaçu, 8 de dezembro de 2022.

---

Assinatura do Responsável

Con todo el amor, a mis padres Catalina y Jorge, dedico este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios, quien es vida, amor y esperanza por ser mi guía y fortaleza en cada etapa de mi vida.

A mis padres, Catalina y Jorge, por el apoyo y el amor incondicional que me regalan cada día, por inculcarme el amor al estudio y por impulsarme siempre a seguir mis sueños.

A mis sobrinos, quienes son la inspiración de mi vida.

A mi profesora y orientadora Dr<sup>a</sup>. Leticia Priscilla Arantes, por la disponibilidad y entrega hacia sus alumnos, por el amor y la paciencia con la que nos acompañó durante todo el trabajo.

A mi profesor y coorientador Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini, por la disposición y el acompañamiento, y a los profesores Dr. Jorge Luis Maria Ruiz y Dra. Caroline da Costa Silva Gonçalves por aceptar evaluar mi trabajo siendo parte de la banca examinadora.

Al Parque Tecnológico Itaipu Paraguay, por brindarme apoyo económico en estos 5 años de estudio a través del proyecto AEP-COHORTE/2018.

## RESUMEN

Algunos fármacos, como las hormonas naturales estradiol (E2) y sintéticos, presentes en píldoras anticonceptivas como etinilestradiol (EE2) han sido identificados en distintas matrices ambientales. Está comprobado que este tipo de compuesto pueden acarrear efectos perjudiciales a la fauna acuática, propiciando diversos daños morfológicos, metabólicos y alteraciones del tipo sexual. La principal herramienta de eco toxicología para evaluar los efectos tóxicos de una sustancia química en un ecosistema acuático, es por medio de ensayos de monitoreo biológico utilizando organismos modelos. En este trabajo, se evaluó los efectos causados por la exposición del medicamento anticonceptivo Etinilestradiol + Levonorgestrel en una concentración de 10 mg/L utilizando al organismo modelo *C. elegans*, antes y después de ser metabolizados por hongos tolerantes aislados del antiguo vertedero "Arroio Dourado". Se analizaron los comportamientos de locomoción, latidos faríngeos, número de huevos en útero y la capacidad de supervivencia y desarrollo de los gusanos. Se llevaron a cabo 3 grupos de exposición: gusanos en etapa larval L1, por la exposición de 1 hora y posterior retirada de los compuestos, gusanos en etapa L1, sin la retirada de los compuestos y en gusanos en etapa larval L4. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los grupos analizados, anticonceptivo y anticonceptivo metabolizado por el hongo tolerante (AMHT), en relación al control M9, en los ensayos de supervivencia, latidos faríngeos, capacidad de desarrollo y número de huevos en el útero, en ninguna de los 3 grupos de exposición (exposición en L1 con lavado, L1 sin lavado y exposición en L4). Sin embargo, se observó una disminución en el número de *thrashes* al evaluar la locomoción de los gusanos tratados con el grupo AMHT, tanto en etapa larval L1 como en L4. La concentración de medicamento utilizada y otros parámetros no permiten concluir que el medicamento por sí solo o post-metabolización sean seguros y confiables para los organismos biológicos expuestos a ellos, en ambientes controlados o en la naturaleza.

**Palabras clave:** anticonceptivo; levonorgestrel; etinilestradiol; *C. elegans*; hormonas.

## RESUMO

Algumas drogas, como os hormônios naturais estradiol (E2) e sintéticos, presentes nas pílulas anticoncepcionais, como o etinilestradiol (EE2), foram identificadas em diferentes matrizes ambientais. Está comprovado que este tipo de composto pode causar efeitos prejudiciais à fauna aquática, causando diversos danos morfológicos, metabólicos e alterações sexuais. A principal ferramenta da ecotoxicologia para avaliar os efeitos tóxicos de um produto químico em um ecossistema aquático é por meio de ensaios de monitoramento biológico usando organismos modelo. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos causados pela exposição ao anticoncepcional Etinilestradiol + Levonorgestrel na concentração de 10 mg/L utilizando o organismo modelo *C. elegans*, antes e após ser metabolizado por fungos tolerantes isolados do antigo Arroio Dourado, aterro sanitário. Foram analisados comportamentos de locomoção, batimentos faríngeos, número de ovos in utero e capacidade de sobrevivência e desenvolvimento dos vermes. Foram realizados três grupos de exposição: vermes no estágio larval L1, por exposição por 1 hora e posterior retirada dos compostos, vermes no estágio L1, sem a retirada dos compostos, e vermes no estágio larval L4. Os resultados não mostraram diferenças significativas nos grupos analisados, anticoncepcional e anticoncepcional metabolizado pelo fungo tolerante (AMHT), em relação ao controle M9, nos testes de sobrevivência, batimento cardíaco faríngeo, capacidade de desenvolvimento e número de ovos no útero, em nenhum dos 3 grupos de exposição (exposição em L1 com lavagem, L1 sem lavagem e exposição em L4). No entanto, observou-se uma diminuição no número de surras ao avaliar a locomoção dos vermes tratados com o grupo AMHT, tanto na fase larval L1 quanto L4. A concentração do fármaco utilizado e outros parâmetros não permitem concluir que o fármaco sozinho ou pós-metabolização seja seguro e confiável para organismos biológicos expostos a eles, em ambientes controlados ou na natureza.

## ABSTRACT

Over time, drugs and pharmaceuticals have become significant environmental pollutants. Some drugs, such as the natural and synthetic hormones estradiol (E2), present in birth control pills such as ethinyl estradiol (EE2) have been identified in different environmental samples. It has been proven that this type of compound can cause detrimental effects to aquatic fauna, causing several morphological and metabolic damages and sexual alterations. The main ecotoxicology tool to assess the toxic effects of a chemical in an aquatic ecosystem is through biological monitoring assays using model organisms. In this work, the effects caused by exposure to the contraceptive drug Ethinyl estradiol + Levonorgestrel were evaluated at a concentration of 10 mg/L using the model organism *C. elegans*, before and after being metabolized by tolerant fungi isolated from the old landfill "Arroio Dourado". Locomotion behaviors, pharyngeal beats, number of eggs in uterus and the survival and development capacity of the worms were analyzed. Three exposure groups were carried out: worms at the L1 larval stage, by exposure for 1 hour and subsequent withdrawal of the compounds, worms at the L1 stage, without the withdrawal of the compounds, and worms at the L4 larval stage. The results did not show significant differences in the groups analyzed, contraceptive and contraceptive metabolized by the tolerant fungus (AMHT), compared to the control M9 buffer in the survival tests, pharyngeal heartbeat, development capacity and number of eggs in the uterus in none of the 3 exposure groups. However, a decrease in the number of thrashes was observed when evaluating the locomotion of the worms treated with the AMHT group, both in the L1 and L4 larval stages. The metabolites present in this compound could have interfered in the formation of motor neurons, altering the response of specific receptors belonging to the "Cys-loop" family, involved in muscle contraction and locomotion of nematodes. This opens the hypothesis that the metabolized contraceptive may present a different toxicity from that caused by the original drug, leaving space for more work in the area to be carried out to confirm the results obtained in these trials. The drug concentration used and other parameters do not allow us to conclude that the drug alone or post-metabolized are safe and reliable for biological organisms exposed to them, in controlled environments or in nature.

**Keywords:** contraceptives; levonorgestrel; ethinyl estradiol; *C. elegans*; drugs.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vías de exposición en la determinación de fármacos en agua.....	17
Figura 2 - Vista aérea del antiguo vertedero Arroio Dourado.....	22
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> .....	26

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Porcentaje de supervivencia en <i>C. elegans</i> en exposición L1 frente al anticonceptivo y AMHT .....	41
<b>Gráfico 2</b> - Porcentaje de supervivencia en <i>C. elegans</i> en exposición L1, sin lavado, frente al anticonceptivo y AMHT .....	42
<b>Gráfico 3</b> - Porcentaje de supervivencia en <i>C. elegans</i> en exposición L4 frente al anticonceptivo y AMHT .....	43
<b>Gráfico 4</b> - Porcentaje de desarrollo de los <i>C. elegans</i> 48 h después de la exposición al anticonceptivo y AMHT en etapa larval L1. ....	44
<b>Gráfico 5</b> - Porcentaje de desarrollo de los <i>C. elegans</i> 48 h después de la exposición al anticonceptivo y AMHT en etapa larval L1, sin lavado.....	44
<b>Gráfico 6</b> - Porcentaje de desarrollo de los <i>C. elegans</i> 72 h después de la exposición al anticonceptivo y AMHT en etapa larval L1 .....	45
<b>Gráfico 7</b> - Porcentaje de desarrollo de los <i>C. elegans</i> 72 h después de la exposición al anticonceptivo y AMHT en etapa larval L1, sin lavado.....	45
<b>Gráfico 8</b> - Porcentaje de desarrollo de los <i>C. elegans</i> 24 h después de la exposición al anticonceptivo y AMHT en etapa larval L4. ....	46
<b>Gráfico 9</b> – Número de <i>thrashes</i> en 20 s en <i>C. elegans</i> frente a la exposición del anticonceptivo y AMHT en exposición L1.....	48
<b>Gráfico 10</b> - Número de <i>thrashes</i> en 20 s en <i>C. elegans</i> frente a la exposición del anticonceptivo y AMHT en exposición L4.....	49
<b>Gráfico 11</b> - Número de <i>thrashes</i> en 20 s en <i>C. elegans</i> frente a la exposición del anticonceptivo y AMHT en exposición L1, sin lavado.....	51
<b>Gráfico 12</b> – Latidos faríngeos contabilizados en 10 segundos en los <i>C. elegans</i> frente al tratamiento del anticonceptivo y AMHT en exposición L1. ....	52
<b>Gráfico 13</b> - Latidos faríngeos contabilizados en 10 segundos en los <i>C. elegans</i> frente al tratamiento del anticonceptivo y AMHT en exposición L1, sin lavado.....	53
<b>Gráfico 14</b> - Latidos faríngeos contabilizados en 10 segundos en los <i>C. elegans</i> frente al tratamiento del anticonceptivo y AMHT en exposición L4 .....	53
<b>Gráfico 15</b> – Número de huevos en el útero de los <i>C. elegans</i> frente a la exposición del anticonceptivo y AMHT en etapa larval L1. ....	55
<b>Gráfico 16</b> - Número de huevos en el útero de los <i>C. elegans</i> frente a la exposición del anticonceptivo y AMHT en etapa larval L1, sin lavado.....	56

**Gráfico 17** - Número de huevos en el útero de los *C. elegans* frente a la exposición del anticonceptivo y AMHT en etapa larval L4. ....57

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> - Dosis, fórmula, estructura química, clasificación y nombre comercial del medicamento utilizado.....	31
<b>Tabla 2</b> - Condiciones de tratamiento para todos los grupos experimentales.....	35

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1	FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES AMBIENTALES.....	16
2.2	EFFECTOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	18
2.3	MICROORGANISMOS Y ENZIMAS ENVUELTAS EN LA DEGRADACIÓN DE FÁRMACOS .....	19
2.4	ESCENARIO DE INVESTIGACIÓN.....	21
2.5	BIOINDICADORES DE TOXICIDAD DE AMBIENTES ACUÁTICOS.....	24
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
5.1	OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO .....	30
5.2	PRODUCTOS QUÍMICOS, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO .....	30
5.2.1	Medicamentos.....	30
5.2.2	Reactivos Y Medios De Cultivo.....	31
5.3	PREPARACIÓN DE LOS ORGANISMOS BIOLÓGICOS .....	32
5.3.1	Climatización, Exposición Al Medicamento Y Ensayo De Viabilidad Celular Del Microorganismo .....	32
5.3.2	Cultivo, Manutención, Almacenamiento Y Sincronización De <i>C. elegans</i> .....	33
5.4	RECUPERACIÓN DEL ANTICONCEPTIVO METABOLIZADO POR HONGOS TOLERANTES (AMHT) .....	33
5.5	EXPOSICIÓN DEL AMHT EN <i>C. ELEGANS</i> .....	34
5.6	EFFECTOS DE LOS AMHT EN <i>C. ELEGANS</i> .....	35
5.6.1	Supervivencia .....	35
5.6.2	Capacidad De Desarrollo.....	36
5.6.3	Locomoción.....	36

5.6.4	Latidos Faríngeos .....	37
5.6.5	Número De Huevos En El Útero .....	37
5.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	37
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
6.1	REACTIVACIÓN Y ENSAYO DE TTC EN LA CEPA FÚNGICA (FAR 03) .....	39
6.2	RECUPERACIÓN DEL AMHT .....	39
6.3	ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO Y DESARROLLO EN <i>C. ELEGANS</i> .....	39
6.4	SUPERVIVENCIA.....	41
6.5	CAPACIDAD DE DESARROLLO .....	43
6.6	LOCOMOCIÓN .....	47
6.7	LATIDOS FARÍNGEOS .....	51
6.8	NÚMERO DE HUEVOS EN EL ÚTERO .....	54
<b>7</b>	<b>CONSIDERACIONES FINALES .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>60</b>
	<b>MATERIAL SUPLEMENTAR 1 .....</b>	<b>75</b>
	GRÁFICOS CORRESPONDIENTES A LOS CONTROLES DERIVADOS DE EXPOSICIÓN EN L1 .....	75
	GRÁFICOS CORRESPONDIENTES A LOS CONTROLES DERIVADOS DE EXPOSICIÓN EN L1 SIN LAVADO.....	78
	GRÁFICOS CORRESPONDIENTES A LOS CONTROLES DERIVADOS DE EXPOSICIÓN EN L4.....	81
	<b>MATERIAL SUPLEMENTAR 2 .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

Según la literatura, 97,5% del volumen total del agua en la Tierra, son de agua salada, formando los océanos y solamente 2,5% es de agua dulce. La mayor parte de esa agua dulce está almacenada en los casquetes polares y glaciares. El agua de los lagos y ríos constituye la forma más accesible de los recursos hídricos al uso humano, correspondiendo apenas al 0,27% del volumen de agua dulce de la Tierra y cerca del 0,007% del volumen total (ZECHINELLI LEZAMA, 2018).

En Brasil, a pesar del agua ser considerada un recurso abundante, existen áreas muy carentes al punto de transformarlas en un bien limitado a las necesidades del hombre. Normalmente, su escasez es mucho más grave en regiones donde el desarrollo ocurre de manera desordenada, provocando la deterioración de las aguas disponibles, debido al lanzamiento indiscriminado de residuos domésticos, industriales, agrotóxicos y otros contaminantes (MOITA; CUDO, 1991). El agravo ocurre con el crecimiento poblacional y, consecuentemente, la ampliación de los niveles de consumo individual, aumentando la presión sobre los manantiales de abastecimiento público (MEDFU TAREKEGN; ZEWDU SALILIH; ISHETU, 2020).

La forma más común de disposición inadecuada de los residuos sólidos urbanos es en vertederos ilegales, en los cuales, los residuos son descartados sobre el suelo desprotegido y permanecen a cielo abierto, causando una vasta degradación ambiental. Además de la problemática de la contaminación al medio, los vertederos ilegales provocan impactos sociales y causan daños a la salud de las personas que viven en esos locales, muy probablemente a los catadores de basuras reciclables que actúan dentro de esos locales de manera insalubre (VARGAS ARAUJO, 2019).

En Foz do Iguaçu (PR), el antiguo vertedero “Arroio Dourado”, se encuentra en las proximidades de un afluente del Río Tamandúá, donde está situado un punto de captación de agua de SANEPAR, órgano responsable por el abastecimiento de la ciudad (MÂNICA; KUO, 2011). Tras su clausura en los años 90, y sin la debida recuperación del área degradada, y consecuentemente, con la expansión urbana en la ciudad, diversas familias carentes establecieron su residencia en esa región, siendo por falta de empleo o falta de vivienda adecuada (OLIVEIRA; RAMIREZ; DI LAURO, 2021). La población de esta localidad consume agua de pozos excavados sobre el vertedero y de un pozo artesiano en las proximidades del mismo, por lo que ha sido objeto de diversos estudios que buscan determinar

la calidad y el riesgo de exposición a contaminantes del agua del arroyo (DA SILVA *et al.*, 2021).

En los últimos años, ha habido un creciente interés por estudiar la biohabitabilidad y los efectos tóxicos de los contaminantes farmacéuticos sobre los microorganismos ambientales, que actúan como sistemas de respuesta primaria y desencadenan las reacciones adaptativa (IVSHINA *et al.*, 2019). Un estudio realizado por Grignet (2022), la cual evaluó el potencial biodegradador de medicamentos por microorganismos aislados del arroyo Arroio Dourado, encontró múltiples hongos y bacterias capaces de sobrevivir ante la exposición de los mismos. En el mismo, se enfocó su uso como procesos alternativos y complementarios para remover microcontaminantes emergentes, detectados en los ecosistemas acuáticos de la región de la triple frontera, visando a la aplicación en el campo de la biotecnología y de la biorremediación.

Los fármacos son considerados microcontaminantes ambientales (HUANG *et al.*, 2020), incluso, alguno de ellos, son considerados desreguladores endocrinos (DEs) y pueden ser definidos como compuestos naturales o sintéticos que mimetizan o interfieren en la acción natural del sistema endocrino en animales y humanos (FARIAS *et al.*, 2020). Un ejemplo de estos son compuestos presentes en las hormonas anticonceptivas, como el etinilestradiol, estrona o estriol. Otras clases farmacológicas constituyen sustancias químicas como antitérmicos, antibióticos, antiinflamatorios y antidepresivos (DE SOUSA *et al.*, 2020; RIBAS *et al.*, 2021; ŽUR *et al.*, 2018).

Según Farias *et al.* (2020), la contaminación ambiental por productos farmacéuticos tiende a empeorar con el pasar de los años, pues con el aumento de la expectativa de vida y, consecuentemente, aumento poblacional, ocurre mayor consumo de esas sustancias. El mismo estudio resalta que las principales causas de contaminación ambiental están relacionadas a la práctica de que las personas no se dan cuenta de que productos farmacéuticos son peligrosos para el ambiente, por esto, usan los fármacos de manera inadecuada (FARIAS *et al.*, 2020). Por lo tanto, estudios enfocados en esta área, son de suma importancia, así como determinar modelos biológicos que contribuyan en el monitoreo y control de la salubridad de los recursos hídricos.

El modelo biológico *Caenorhabditis elegans* ha sido ampliamente utilizado para estudios genéticos y bioquímicos debido a su corto ciclo de vida (2-3 semanas) simple manipulación en laboratorio y con numerosa descendencia que permite hacer estudios estadísticos. El mismo, posee una gran similitud genética y fisiológica con el humano; entre un 60 % y un 80 % de homología (KALETTA; HENGARTNER, 2006). De hecho, la mayoría de

sus procesos fisiológicos básicos y de respuesta a estrés están conservados tanto en otros nematodos parásitos como en organismos superiores (incluyendo humanos) (CLAVIJO LARA, 2017). Se han estudiado una gran cantidad de genes en los nematodos permitiendo descubrir diversas vías de señalización y mecanismos de regulación para contribuir al estudio de patologías y nuevos tratamientos (TORGOVNICK *et al.*, 2013). El uso de *C. elegans* como modelo biológico en evaluaciones toxicológicas ambientales permite la determinación de múltiples criterios de valoración. Algunos de estos utilizan los efectos sobre las funciones biológicas del nematodo y otros utilizan marcadores moleculares (TEJEDA-BENITEZ; OLIVERO-VERBEL, 2016).

De esta forma, el presente trabajo propone evaluar los efectos causados sobre la exposición del medicamento de clase hormonal Etinilestradiol 30 µg + Levonorgestrel 150 µg, al organismo modelo *C. elegans* tras ser metabolizados por microorganismos tolerantes a los mismos, previamente aislados del antiguo vertedero “Arroio Dourado”, ubicado en Foz do Iguaçu - PR. El objeto de este estudio visa realizar un análisis preliminar de la calidad del agua de esa localidad, con relación a los parámetros biológicos, así como la evaluación del riesgo de exposición de la población cercana hacia los contaminantes emergentes del tipo fármaco, encontrados en las aguas, desde que, hayan sido procesados por hongos presentes en el recurso hídrico de la localidad.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fármacos como contaminantes ambientales

Al final del siglo XIX, los medicamentos consumidos en el Brasil eran originarios de las actividades de pequeños y medianos laboratorios nacionales, en cambio, al inicio del siglo XX, las industrias farmacéuticas nacionales crecieron, por lo que, las farmacias, ganaron gran popularidad. Actualmente los fármacos forman parte del cotidiano de la población, siendo utilizados en el tratamiento de enfermedades, reposición hormonal, entre otros (RODRIGUES, 2009).

Con el correr del tiempo, los productos farmacéuticos se han convertido en contaminantes ambientales, y la preocupación hacia los mismos es cada vez mayor, debido a su potencial de bioacumulación y ecotoxicidad, los cuales podrían representar un riesgo para los organismos vivos (KÜMMERER, 2009). Después del consumo, los productos farmacéuticos no metabolizados y sus metabolitos se excretan y pasan a las aguas residuales como sustancias biológicamente activas (KÜMMERER, 2009).

Recientemente, el monitoreo de medicamentos en el medio ambiente, viene ganando interés debido al hecho de que muchas de esas sustancias son frecuentemente encontradas en concentraciones altas en las estaciones de tratamiento de residuos y aguas naturales. Estudios demuestran que varias de estas sustancias parecen ser persistentes en el medio ambiente y no son completamente removidas incluso después de pasar por las plantas de tratamiento de aguas (CERON, 2011). Esto, porque la mayoría de ellas presentan alta solubilidad y bajas velocidades de degradación, características que facilitan su permanencia y persistencia en el medio ambiente, sin tener en cuenta, el continuo aporte acumulativo (MONTAGNER *et al.*, 2019). Cabe resaltar que en las últimas décadas hubo un aumento significativo en el consumo de medicamentos en todo el mundo, inclusive en el Brasil, principalmente aquellos vendidos sin prescripción médica, como son los analgésicos y antitérmicos y los de uso continuo como los anticonceptivos y antidepresivos (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Algunos fármacos son considerados desreguladores endocrinos (DEs), los cuáles pueden ser definidos como compuestos naturales o sintéticos que mimetizan o interfieren en la acción natural del sistema endocrino en animales y humanos (MAIA, 2021). Son varios los compuestos pertenecientes a este grupo, sin embargo, las hormonas naturales estradiol (E2) y sintéticos, presentes en píldoras anticonceptivas como etinilestradiol (EE2) y los metabolitos oriundos del metabolismo de estos compuestos, como estrona (E1) y el estriol (E3) han sido

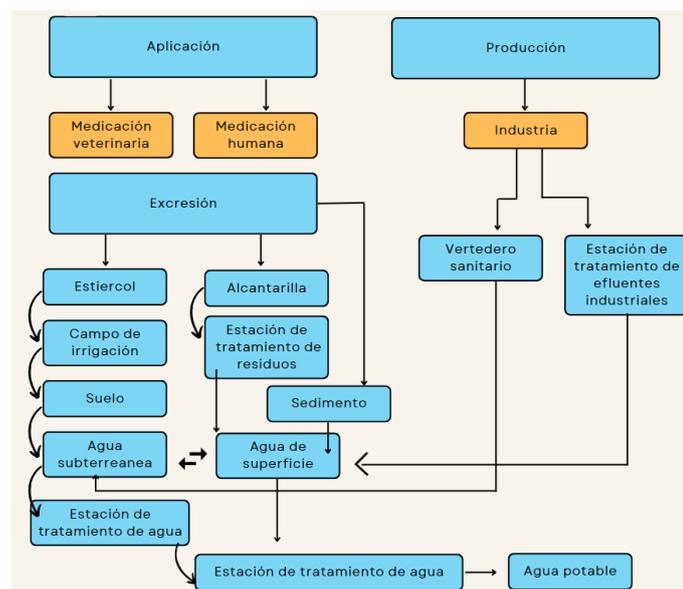
identificados en distintas matrices ambientales (FARTO *et al.*, 2021; MONTAGNER *et al.*, 2019).

En Brasil, desde la década de los 90, son realizados estudios que permiten determinar la presencia de contaminantes emergentes, entre ellos farmacéuticos, en los ecosistemas acuáticos (LANCHOTE *et al.*, 2000). Desde entonces, diversos ensayos han sido desarrollados para detectar estos contaminantes en las distintas matrices acuáticas brasileñas (DE SOUSA *et al.*, 2020; MONTAGNER *et al.*, 2019; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Muchos de los compuestos evaluados en Brasil, están entre aquellos preconizados por la Unión Europea para el monitoreo de fármacos en aguas de abastecimiento público. Entre esas sustancias se encuentran las hormonas (SOUZA, 2017). Las hormonas son los compuestos más estudiados en Brasil y el mundo, pues permanecen en el medio ambiente y son capaces de interferir sobre el sistema endócrino, pudiendo causar daños a diferentes organismos (GLASSMEYER *et al.*, 2017) incluyendo peces, algas, moluscos, bivalvos, entre otros (ADEEL *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2020; SIVARANJANEE; KUMAR, 2021).

Poco se conoce sobre la ruta de los fármacos en el medio ambiente, sin embargo, su ocurrencia, puede presentar efectos adversos en organismos acuáticos y terrestres. Tales efectos ocurren en cualquier nivel de jerarquía biológica, como células, órganos, organismos, población, ecosistema (CERON, 2011). En la figura 1, se muestra esquemáticamente la introducción de los productos farmacéuticos en el ambiente acuático.

Figura 1 - VÍAS DE EXPOSICIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS EN AGUA



Fuente: Adaptado de (CERON, 2011).

Las rutas de contaminación pueden ser por fuentes puntuales, así como difusas. Las fuentes puntuales son de fácil identificación, y ocurren a través de las estaciones de tratamientos de residuos, efluentes *in natura* directamente en los ambientes acuáticos, eliminación de compuesto puro sin uso, residuos industriales y farmacéuticos, de hospitales y otros servicios de salud (efluentes hospitalares). Las fuentes difusas, en cambio, acostumbran a ser en áreas extensas y están asociadas principalmente al caudal superficial de las aguas pluviales y lixiviación de los compuestos en el suelo (BISOGNIN; WOLFF; CARISSIMI, 2018; BRANCO *et al.*, 2021; QUADRA *et al.*, 2018).

Con todo esto, cabe resaltar que uno de los principales inconvenientes se refiere a la falta de información de gran parte de la población en cuanto a los métodos y conducta adecuados para el descarte de tales productos y al impacto del descarte inapropiado que los mismos pueden causar al medio ambiente, incluyendo al propio ser humano, pues los embalajes de los productos farmacéuticos no proveen instrucciones respecto a cómo proceder con los residuos, al contrario de muchos otros productos industrializados de otros sectores. No obstante, esto se debe principalmente por la falta de legislación para establecimientos comerciales como farmacias y centros de salud, las cuales no son obligadas a recoger esos productos, aunque los mismos todavía se encuentren dentro del plazo de validez. Dichos establecimientos tampoco poseen estructura organizacional ni requieren pasar por fiscalización en lo que se refiere a certificados y licencias para mantenerse activas en el mercado. A pesar de que muchos de estos establecimientos cuentan con el apoyo de la prefectura del municipio para destinar sus residuos, es común que esta última no disponga de recursos especializados para lidiar adecuadamente con el material. Por otro lado, Brasil posee baja infraestructura en relación a la falta de vertederos sanitarios adecuados e incineradores licenciados en vasta región de su territorio, lo que compromete aún más la aplicabilidad de medidas ágiles que puedan, al menos, minimizar el problema (CERON, 2011).

## 2.2 Efectos ecotoxicológicos

Está comprobado que tanto los fármacos no hormonales como los hormonales (desreguladores endocrinos) pueden acarrear efectos perjudiciales a la fauna acuática, propiciando diversos daños morfológicos, metabólicos y hasta alteraciones de tipo sexual. Dentro de estas alteraciones, existen efectos y daños en la producción de esperma y feminización de machos, declino en la capacidad de reproducción y hasta ocurrencia de óbitos y maleficios en los descendientes (ADEEL *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2017; RASHEED *et al.*, 2019; SIVARANJANEE; KUMAR, 2021).

Anteriormente, algunos investigadores trabajaron con un grupo específico de compuestos químicos presentes en el medio ambiente que son responsables por causar perturbaciones en el sistema endócrino (hormonal) de organismos humanos y animales: son los llamados perturbadores endócrinos. Dentro de ese grupo de sustancias están los estrógenos naturales y anticonceptivos (BELFROID *et al.*, 1999; TERNES; KRECKEL; MUELLER, 1999). Algunos autores relataron que, dependiendo de la dosis y del tiempo de exposición, es posible que esas sustancias estén relacionadas con enfermedades como el cáncer de mama, testicular y de próstata, ovarios poliquísticos y reducción de la fertilidad masculina (CERON, 2011).

Las evidencias mostraron que, los sistemas reproductivos de ciertos organismos terrestres y acuáticos son afectados por estrógeno, resultando en el desarrollo de anomalías y deterioración reproductiva en los organismos expuestos (MATTHIESSEN *et al.*, 2002). En un experimento con tortugas de la especie *Chrysemys picta*, Irwin y colaboradores (2001) mostraron que las tortugas femeninas expuestas a estrógenos son afectadas con altos niveles de VTG en el plasma, el cual es una proteína reproductiva específica de las hembras que proporcionan nutrientes para los embriones. Esos altos niveles pueden alterar el sistema reproductivo de estos animales como, por ejemplo, alteraciones en la producción de huevos (IRWIN; GRAY; OBERDÖRSTER, 2001). En otro estudio de Rodgers-Gray *et al.* (2001), peces jóvenes de la especie *Rutilus rutilus* fueron expuestos a concentraciones graduales de efluentes provenientes de estaciones de tratamientos de residuos por 150 días. Los resultados mostraron que la exposición indujo la feminización de peces machos. Subsecuentemente, los peces fueron gradualmente expuestos a aguas naturales por más de 150 días, resultando en la reducción de los VTG en el plasma, a pesar de que no se observó alteración en el sistema sexual feminizado de los peces, indicando que el desarrollo de la anomalía en el sistema reproductivo, fue permanente.

Este y otros estudios respaldan la presencia de este fármaco en diversos medios. A pesar de los mismos ser encontrados en bajas concentraciones, las hormonas anticonceptivas, como también otros medicamentos en general, pueden causar toxicidad a los organismos (BILA; DEZOTTI, 2003; LIMA *et al.*, 2017; RODGERS-GRAY *et al.*, 2001).

### 2.3 Microorganismos y enzimas envueltas en la degradación de fármacos

El consumo de elevadas cantidades de fármacos por la población en todos los niveles sociales, es una realidad. Por otro lado, aún no existe un sistema de tratamiento que contemple la remoción o transformación completa de estos compuestos en las matrices

ambientales (MOLINA *et al.*, 2020; ROUT *et al.*, 2021). Una de las alternativas complementares actualmente implantadas y que demuestran potencial son los procesos biológicos de biorremediación, envolviendo microorganismos específicos en biorreactores, enzimas, o plantas previamente seleccionadas, con conocida capacidad de degradar estos compuestos (MARTÍNEZ-ALCALÁ; GUILLÉN-NAVARRO; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2017; RIBAS *et al.*, 2021). Estudios previos han mostrado la eficacia de estos procesos en el tratamiento del agua residual contaminada con una gran cantidad de productos químicos y farmacéuticos (JOSS *et al.*, 2006; KOSJEK; HEATH; KOMPARE, 2007).

Los microorganismos, tales como hongos y bacterias, presentan propiedades interesantes para aplicación en diversos tipos de reacciones enzimáticas en relación a los procesos convencionales. Estos microorganismos son de fácil cultivo en laboratorio y son capaces de biotransformar y/o degradar una variedad de compuestos xenobióticos en moléculas de menor peso molecular, las cuales pueden formar productos con una toxicidad diferente del compuesto original (ALVARENGA *et al.*, 2015; PARRA GUARDADO *et al.*, 2019).

Las reacciones involucradas en el proceso de metabolización son múltiples y diversas, y en general, puede considerarse que tienen lugar en dos fases. Las reacciones de fase I o de funcionalización consisten en reacciones de oxidación y reducción, que alteran o crean nuevos grupos funcionales, así como reacciones de hidrólisis, que rompen enlaces ésteres y amidas liberando también nuevos grupos funcionales. Estos cambios determinan algunos o varios de estos resultados: inactivación, conversión de un producto inactivo en otro activo, conversión de un producto activo en otro también activo, cuya actividad aprovechable con fines terapéuticos puede ser cualitativamente similar o distinta de la del fármaco original, conversión de un producto activo en otro activo, pero cuya actividad resulta tóxica (DEL ARCO, 2008) y reacciones de conjugación (biosíntesis) de fase II (CARRILLO NORTE, 2011).

Para procesos de biorremediación, los microorganismos utilizan enzimas que actúan como catalizadores de varias reacciones bioquímicas en la degradación de contaminantes. Algunos ejemplos son las oxidorreductasas, las lacasas, las hidrolasas y las peroxidasas, que muchas veces son aisladas y usadas para optimizar los procesos biotecnológicos, pues en condiciones naturales la producción generalmente ocurre en bajas cantidades (ENGELKIRK; ENGELKIRK, 2000; SHARMA; PANT, 2018).

Bajo el alcance del entorno extremo, se evidencia que, cuando expuestos a algún estrés ambiental, una comunidad microbiana tiene el crecimiento de especies más susceptibles al medio perjudicado, favoreciendo, por lo tanto, a la selección y el aumento en la producción de enzimas y metabolitos no primarios de la población seleccionada, prevaleciendo

así, en ese ambiente (BARRIOS-ESTRADA *et al.*, 2018; SPEDA *et al.*, 2017). De esta manera, los microorganismos nativos pueden desarrollar la capacidad de degradar contaminantes, aun así, la degradación puede verse afectada por procesos intrínsecos y extrínsecos de cada microorganismo en metabolizar ciertas sustancias. De esta forma, es posible que haya la necesidad de adecuarlos para promover condiciones favorables a los procesos biológicos y obtener mejores resultados en un intervalo de tiempo menor (VARJANI; UPASANI, 2021).

Los mecanismos de degradación que presentan ciertos hongos han sido utilizados para mineralizar diversos medicamentos, los cuales provocan efectos dañinos cuando son descargados en aguas superficiales y subterráneas. La actividad enzimática de los hongos es una alternativa para el tratamiento de aguas que contienen productos farmacéuticos recalcitrantes como son el naproxeno, la carbamazepina, el ácido fólico, el diclofenaco sódico y el ibuprofeno (HOLANDA *et al.*, 2019; MARCO-URREA; REDDY, 2012; MONICA *et al.*, 2011).

En el caso de las hormonas presentes en la biosfera, pueden ser mineralizadas por microorganismos que usan estos compuestos como fuentes de energía y carbono. Las hormonas son degradadas aeróbicamente por medio del uso de oxígeno como un sustrato de las oxigenasas para activar y clivar el anillo central recalcitrante de esos esteroides (CHIANG *et al.*, 2020). En el caso específico de la progesterona, algunas investigaciones relatan a las enzimas monooxigenasas, hidroxilasas, dioxigenasas, hidrogenasas, como activas en el proceso de biodegradación (CHIANG *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020; OJOGHORO; SCRIMSHAW; SUMPTEP, 2021).

Partiendo de esto, vienen siendo desarrolladas investigaciones con el objetivo de aislar nuevos linajes microbianos de los ambientes extremos (pH bajo o alto, alta salinidad, alta o bajas temperaturas, alta concentración de solventes orgánicos e inorgánicos, efluentes domésticos e industriales) con el fin de aumentar la producción de enzimas con potencial biotecnológico (AMENABAR; BOYD, 2019; PARRA GUARDADO *et al.*, 2019; PHOON *et al.*, 2020).

#### 2.4 Escenario de investigación

La ciudad de Foz do Iguaçu (PR) está localizada sobre las coordenadas geográficas 25° 32' 45" Sur y 54° 35' 07" y se sitúa en el extremo oeste del Estado de Paraná. Su acceso terrestre se da por la Rodovia Federal BR-277 (Brasil), por el Puente Internacional de la Amistad (Paraguay), y por el Puente Internacional Tancredo Neves (Argentina) (CIDADE-BRASIL.COM.BR, 2021).

Según los datos del Instituto Ambiental do Paraná - IAP, en 2017, 98 de 399 municipios del estado de Paraná aún destinaban sus desechos a locales irregulares (GIMENES; HISING, 2017), siendo Foz do Iguaçu uno de los municipios que posee área propia controlada y que mantiene rigurosamente las determinaciones ambientales. Hasta el año 2001, el municipio no contaba con ningún vertedero sanitario, utilizando apenas basureros, caracterizado por la inexistencia de protección al medio ambiente, hecho preocupante en la época, pues estaba próximo al manantial de captación de aguas de la ciudad (FRIGO, 2011).

El área de objeto de esta investigación se encuentra en la porción sudeste del municipio, en la localidad de Arroio Dourado, localizado entre los paralelos  $25^{\circ}34'04''$  y  $25^{\circ}34'20''$  S, y entre los meridianos  $54^{\circ}30'13''$  e  $54^{\circ}30'10''$  W. El acceso al barrio Arroio Dourado se da por la Avenida Felipe Wandscheer, así como por la rodovia de las Cataratas (PMFI, 2019a) como mostrado en la figura 2. El área de disposición final es de  $145.981,94 \text{ m}^2$  (DALLA VALLE, 2014).

Figura 2 - VISTA AÉREA DEL ANTIGUO VERTEDERO ARROIO DOURADO



Fuente: Adaptado de (DALLA VALLE, 2014).

Esta localidad fue utilizada para disposición de residuos urbanos y hospitalarios entre la década de los 60 y el año 1992. El vertedero Arroio Dourado operó en este periodo en forma de vertedero ilegal, es decir, sin mecanismos de control ambiental necesarios para evitar daños al medio ambiente y a la salud pública, y cuando las actividades fueron clausuradas, tampoco se atendieron los debidos trámites legales para hacerlo (PMFI, 2019). Con el crecimiento poblacional de la ciudad, áreas irregulares como el antiguo vertedero Arroio Dourado, fueron ocupadas por diversas familias de escasos recursos, a pesar de no haber sido implementada ninguna acción de recuperación y/o mitigación del área degradada (GRIGNET, 2022). Incluso, la región fue clasificada como insalubre en 2014, con los residentes de la comunidad sometidos a condiciones precarias, desasistidos por infraestructura,

saneamiento básico, y, servicios públicos (DALLA VALLE, 2014). El mismo, a pesar de su clausura, continúa generando impactos ambientales en el suelo, el aire y en las aguas subterráneas y superficiales. Estos depósitos pueden llevar a la alteración de las características físico-químicas y biológica de las reservas naturales de determinado local (SOARES, 2022).

Esto se ve respaldado por varios estudios, entre ellos, la identificación de gas metano en el subsuelo del vertedero, en donde alegaron que el subsuelo posee mucho vapor de metano, entre otros componentes que, sumados, extinguen cualquier posibilidad de vivienda en ese local (LORENCE; TINO BALESTRA, 2016). Así también, otro estudio relacionado a la calidad del suelo concluyó con concentraciones de metales superiores a los recomendados conforme la Resolución Conama N° 420/2009 y de otros parámetros internacionales, definiendo al local como un ambiente insalubre, pudiendo generar consecuencias negativas a la salud humana, así como al medio ambiente (OLIVEIRA; RAMIREZ; DI LAURO, 2021). En términos de salud y medio ambiente, la disposición inadecuada de los residuos sólidos y la falta de infraestructura de saneamiento básico pueden afectar directa e indirectamente la salud de la población, principalmente para los ocupantes que hacen uso del suelo y los recursos hídricos del local (DALLA VALLE, 2014).

Este antiguo vertedero, Arroio Dourado, le debe su denominación a un arroyo que bordea el área, el arroyo Dourado, el cuál es un afluente de uno de los dos manantiales de abastecimiento de Foz do Iguaçu (DA SILVA *et al.*, 2021). El mismo, desactivado hace 28 años, representa para la comunidad un riesgo muy grande a la salud debido a la exposición a cielo abierto de materiales contaminantes, pudiendo comprometer la calidad de agua de los manantiales locales. En este sentido, un estudio realizado por Soares (2022), en donde se analizó la calidad del agua del Arroio Dourado, en un área sobre influencia del vertedero desactivado, utilizando cepas de *Allium L* mutagénicos, como metodología para investigar el potencial citotóxico y genotóxico de posibles contaminantes presentes en este recurso hídrico, los resultados mostraron algunas alteraciones relevantes en el organismo modelo, y se alega la posible relación con el descarte inadecuado de residuos de origen doméstico y consecuentemente con una posible presencia de metales pesados en las aguas de estudio.

Además de este tipo de contaminación, la detección de contaminación emergente tipo fármacos en aguas residuales superficiales, suelos y sedimentos, también pueden representar un riesgo en la población local. A pesar de los riesgos asociados, tales moléculas aún no son legisladas en la mayoría de los países, inclusive en el Brasil, siendo, por lo tanto, excluidas de los programas de monitoreo de rutina de calidad de agua y de los efluentes antes

de ser lanzados a los cuerpos hídricos (FARTO *et al.*, 2021; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Desde este punto de vista, Grignet (2022), realizó un estudio enfocado en evaluar el potencial biotecnológico de microorganismos aislados del arroyo, relacionados a su capacidad de tolerar, transformar o degradar contaminantes emergentes del tipo medicamentosos, en el cual fueron utilizados 10 clases distintas. Fueron recuperados 106 aislados, entre los cuales se encontraban bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Los resultados parciales apuntaron que 47, 36 % de los hongos aislados, fueron tolerantes a por lo menos un medicamento probado. Para las bacterias, el 19,60 % se mostraron tolerantes. La clase terapéutica que más favoreció el crecimiento de los linajes tolerantes fue la hormonal, principalmente para bacterias y levaduras. Los ensayos demostraron que existe una abundante microbiota presente en el sedimento del arroyo, posiblemente afectado por los residuos de fármacos y otros microcontaminantes oriundos del antiguo vertedero municipal desactivado.

Las cuestiones sanitarias de ese local son de extrema importancia para la región de la triple frontera, desde que el arroyo Arroio Dourado nace en el municipio de Foz do Iguaçu, bordea la ocupación del antiguo “basurero” y desagua en el Río Tamandúá. Aproximadamente 30% de los residentes de Foz de Iguaçu utilizan el agua oriunda de este manantial, volviéndolo importante para inversiones estratégicas de protección de la flora y la biodiversidad local (PMFI, 2020).

## 2.5 Bioindicadores de toxicidad de ambientes acuáticos

La principal herramienta de la ecotoxicología para evaluar los efectos tóxicos de una sustancia química y realizar el monitoreo biológico de un ecosistema acuático, son los ensayos toxicológicos con organismos acuáticos vivos, u organismos modelo, como son denominados (INECC, 2007). Los ensayos ecotoxicológicos son caracterizados por la exposición de organismos acuáticos a varias concentraciones de un efluente o de una sustancia química en un determinado periodo de su ciclo de vida (SÁNCHEZ-BAIN *et al.*, 2004). A través de esos ensayos, efectos letales, mutagénicos, citogenéticos, teratogénicos y fisiológicos pueden ser observados (SÁNCHEZ-BAIN *et al.*, 2004).

A pesar de que muchas especies pueden ser utilizadas como indicadores de problemas ambientales, ya que los contaminantes presentes en los ecosistemas acuáticos pueden generar impactos en toda biota, de acuerdo con Boutet y Schierwater (2021), los organismos modelo deben ser de fácil colecta y manutención en el laboratorio y deben estar disponible a lo largo de todo el año. Además de esto, es de suma importancia el conocimiento

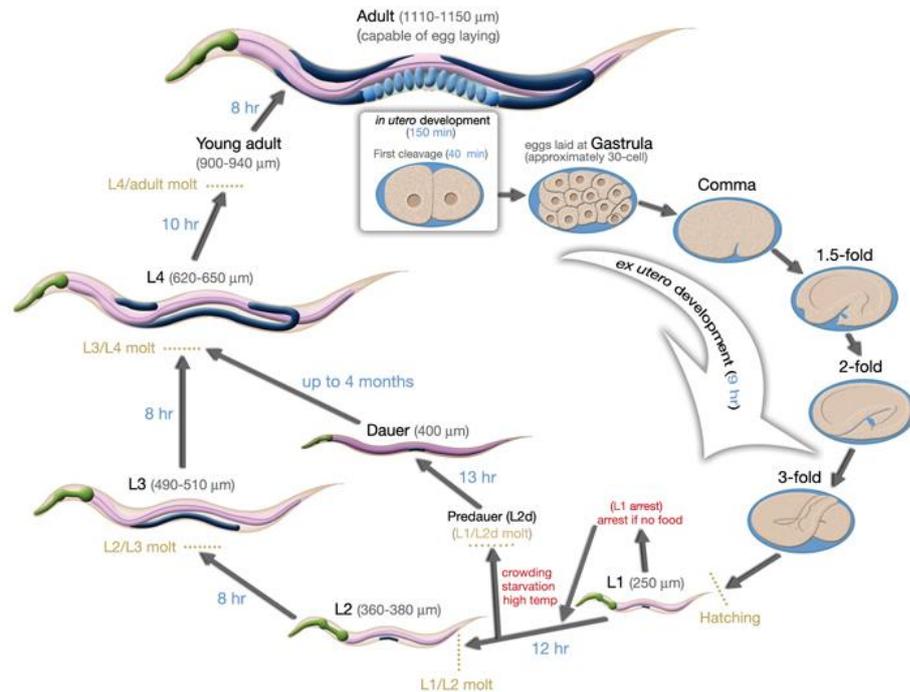
del ciclo de vida y de la sensibilidad de estos organismos a sustancias de referencia, como también la elección de organismos autóctonos (BOUTET; SCHIERWATER, 2021).

Según Page y Johnstone (2007), *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) sirve como un buen modelo para ilustrar cómo las exposiciones químicas por ingestión, tanto de alimentos como de agua, pueden representar un peligro para la salud de un organismo desde la embriogénesis hasta la muerte. Debido al hecho de que algunas de sus vías bioquímicas son similares a las de los humanos, se ha empleado en la investigación en varios campos (PAGE; JOHNSTONE, 2007).

Este nematodo no parásito, es uno de los modelos animales mejor establecidos que ha contribuido en gran medida a la comprensión de muchas enfermedades humanas. Es un modelo experimental muy atractivo debido a muchas ventajas: tamaño pequeño, cuerpo transparente, los adultos miden aproximadamente 1 mm de longitud, ciclo de vida corto (3 días aproximadamente), capacidad de autofertilización y alta tasa reproductiva (>300 crías por hermafrodita), lo que hace que su mantenimiento en el laboratorio sea relativamente fácil y económico (RUSZKIEWICZ *et al.*, 2018). La mayoría de los individuos son hermafroditas, con dos ovarios, oviductos, una cavidad para almacenar el esperma, llamada espermateca y un útero (L'HERNAULT, 2006).

El ciclo de vida de estos gusanos pasa por una etapa embrionaria y cuatro etapas larvarias (L1-L4) antes de que los animales alcancen la edad adulta. El desarrollo puede tardar de 2 a 4 días dependiendo de la temperatura y en cada una de las etapas se pueden observar varios rasgos característicos (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012). El ciclo de vida de los *C. elegans* se observa detalladamente en la figura 3.

*C. elegans* se utiliza en estudios toxicológicos desde el nivel del animal completo hasta el nivel de células individuales (TEJEDA-BENITEZ; OLIVERO-VERBEL, 2016). Esta y otras características, lo hacen un excelente organismo para realizar ensayos de laboratorio orientados hacia la identificación de contaminantes tóxicos en los ambientes marinos y terrestres (WILLIAMS; DUSENBERY, 1990). Los mismos poseen sistema reproductivo, nervioso, epitelial, muscular, alimentario y excretor, razón por las que son ampliamente utilizados dentro la investigación.

Figura 3 - CICLO DE VIDA DE *C. ELEGANS*

Leyenda: Ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C. Fertilización a 0 min. Los números en azul que acompaña las flechas indica el tiempo que el animal pasa en una determinada etapa. La primera escisión se produce aproximadamente a los 40 min tras la fertilización. Los huevos son expulsados a los 150 min tras la fertilización. La longitud del animal en cada etapa larval está marcada junto al nombre de la etapa en micrómetros (μm).

Fuente: (ALTUN; HALL, 2009).

Varios autores han utilizado *C. elegans* como organismo modelo para la evaluación de la toxicidad de aguas residuales industriales y municipales, dado que *C. elegans* tiene varias características únicas, que lo hacen un organismo modelo relevante y adecuado para experimentos biológicos (ČADKOVÁ *et al.*, 2020; IMANIKIA *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2016; POLAK *et al.*, 2014). De hecho, hay muchos estudios que han utilizado *C. elegans* para evaluar la toxicidad del agua y del suelo (ABBAS *et al.*, 2018; TEJEDA-BENITEZ; OLIVERO-VERBEL, 2016). En un estudio de toxicidad, los *C. elegans* salvajes expuestos a los extractos de sedimentos superficiales del estero Huaylá de la Parroquia de Puerto Bolívar, mostraron efectos de mortalidad, crecimiento, locomoción y reproducción (GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

*C. elegans* tiene también el potencial de predecir respuestas tóxicas que son comparables con mamíferos (ANDERSON; COLE; WILLIAMS, 2004; COLE; ANDERSON; WILLIAMS, 2004; HUNT; OLEJNIK; SPRANDO, 2012; RALEY-SUSMAN, 2014) pero libre de los problemas éticos que conlleva la experimentación con ellos (CASEY *et al.*, 2015). Relativo a esto, se han hecho análisis *in vivo* del efecto de la exposición de sustancias fitosanitarias sobre mecanismos moleculares que se dan también en eucariotas superiores

(PETERSON *et al.*, 2008; SURJO PRABHA; MANOJ, 2009). También se ha utilizado con éxito para evaluar los efectos farmacológicos y tóxicos de nanopartículas, conocidos como estudios de nanotoxicidad (CHEN; HSIAO; CHOU, 2013; RUI *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2014) de toxicidad de fármacos (MATSUURA; MIURA; NISHINO, 2013; SMITH *et al.*, 2013) y toxinas (LEUNG *et al.*, 2010). La evaluación con *C. elegans* de nanocápsulas poliméricas para la administración de medicamentos también ha mostrado resultados prometedores (CHARAO *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2015).

Investigaciones revelaron el efecto del ibuprofeno en *C. elegans*, las cuales sugieren que existe una vía de señalización alternativa, en donde el fármaco estaría actuando sobre el transportador de triptófano, disminuyendo su alta afinidad y de esta manera desestabilizándolo (HE *et al.*, 2014). Estos nematodos se han utilizado también para la evaluación de la toxicidad de una amplia gama de contaminantes químicos en concentraciones ambientales relevantes, incluidos metales (WU *et al.*, 2013), nanopartículas modificadas (ZHANG *et al.*, 2011) y contaminantes orgánicos (CHEN *et al.*, 2019).

*Caenorhabditis elegans* es un biomodelo muy utilizado en todas las investigaciones médicas básicas y biológicas debido a la facilidad en su manejo, ciclo corto de vida, su genética y proteómico altamente caracterizadas como biomodelo, especialmente en genes relacionados con enfermedades humanas y para la identificación y análisis funcional de fármacos *in vivo* (CINTRA *et al.*, 2019; HUNT, 2017; KOBET *et al.*, 2014; VAHDATI NIA *et al.*, 2017).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Los medicamentos pueden llegar al ecosistema acuático a través de la excreción humana, descarte inadecuado en lavaderos, vasos sanitarios y vertederos, aplicación en la medicina veterinaria, efluentes hospitalarios, entre otros. De este modo, el problema ambiental está directamente relacionado con la dificultad de remover completamente estas sustancias de los cuerpos acuáticos, debido a que los sistemas de tratamiento de residuos convencionales no son lo suficientemente eficaces, por lo que, los mismos son continuamente introducidos en los sistemas acuáticos.

Cuando se refiere al análisis toxicológico, es importante destacar que esta permite detectar toxicidad de la muestra como un todo, mientras que el análisis químico, permite cuantificar las sustancias aisladas presentes en la muestra y obtener datos para la padronización de metodologías. Por esto el monitoreo y la evaluación de áreas que sufren algún tipo de contaminación, no deben ser observados apenas a través de datos de análisis químicos, puesto que estas no evalúan los efectos causados por los contaminantes en los organismos que viven y dependen de tal ecosistema.

Es importante correlacionar los aspectos físico-químicos con las características bióticas del local al cual está siendo realizado un estudio, con eso es posible aumentar el potencial de identificación de las causas y los efectos de los agentes contaminantes del ambiente. Esta teoría se ve respaldada por Kuhn *et al.* (2021) los cuales realizaron un biomonitoreo del Río Uruguay y dos de sus afluentes antes y después de la aplicación de plaguicidas, utilizando *C. elegans* como modelo biológico. Los resultados reforzaron la utilidad de los indicadores biológicos, alegando que, los análisis fisicoquímicos no son suficientes para atestiguar la calidad del agua y la seguridad ecológica.

En el presente trabajo se busca evaluar los efectos causados por la exposición del medicamento de clase hormonal, Etinilestradiol + Levonorgestrel, al ser previamente metabolizado por microorganismos tolerantes aislados del antiguo vertedero “Arroio Dourado”. El análisis será realizado sobre la locomoción, latidos faríngeos, capacidad de desarrollo, supervivencia y número de huevos del nemátodo *Caenorhabditis elegans*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo analizar los posibles efectos tóxicos de un medicamento de clase hormonal tras su metabolización por hongos tolerantes, utilizando el modelo de organismo *Caenorhabditis elegans*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Analizar los efectos del medicamento metabolizado sobre la supervivencia, el desarrollo, el comportamiento y la reproducción de *C. elegans*;
- Comparar los efectos causados en un organismo biológico del medicamento antes y después de ser metabolizados por microorganismos tolerantes.
- Comparar los efectos agudos y crónicos causados por el medicamento antes y después de ser metabolizados, en la primera etapa larval (L1) y en la última etapa larval (L4) de *C. elegans*.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención del material biológico

La cepa fúngica utilizada en este estudio se obtuvo por donación del Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad de Integración Latino-Americana - UNILA, localizado en el Jardín Universitario, Foz do Iguaçu - PR.

La elección del microorganismo se dio conforme los resultados obtenidos a partir de estudios realizados por Grignet (2022), en el cuál se aislaron organismos, bacterias y hongos, de una muestra de agua proveniente de un antiguo vertedero de la ciudad de Foz de Iguaçu. Los mismos, resultaron tolerantes a distintas clases de medicamentos, entre las cuales se encontraban los anticonceptivos.

Para la cepa de hongo utilizada, se empleó la siguiente denominación: FAR 03, adaptado de (GRIGNET, 2022).

En relación a la obtención de los organismos *C. elegans*, las mismas fueron cedidas por el Laboratorio de Neuroprotección y Neurotoxicología Experimental de la Universidad Federal de Santa María, localizada en Santa María - RS.

### 5.2 Productos químicos, soluciones y medios de cultivo

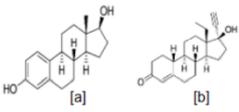
Los medios de cultivo y materiales utilizados fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, 1 atm por 15 minutos.

#### 5.2.1 Medicamentos

Los medicamentos utilizados fueron donados por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental. El mismo es presentado en el Cuadro 01.

El medicamento anticonceptivo, fue escogido en base al trabajo realizado por Grignet (2022), visando el grado de utilización que tienen los mismos en la población actual y basados en su incidencia como contaminantes en aguas de la región.

**Tabla 1 - DOSIS, FÓRMULA, ESTRUCTURA QUÍMICA, CLASIFICACIÓN Y NOMBRE COMERCIAL DEL MEDICAMENTO UTILIZADO**

Compuesto/Dosis	Fórmula	Estructura química	Uso terapéutico	Nombre comercial
Etinilestradiol [a] 30 µg + Levonorgestrel [b] 150 µg	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> [a] + C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> [b]		Anticonceptivo	Ciclo 21® (Levonorgestrel + etinilestradiol)

**Fuente:** Adaptado de (GRIGNET, 2022).

### 5.2.2 Reactivos Y Medios De Cultivo

El Medio Mínimo (MM) fue preparado agregando 0,5% de glucosa, siguiendo lo realizado por Grignet (2022) para el enriquecimiento de las muestras. Su composición consiste en (g/L): Cloruro de Calcio (0,02 g); Fosfato de Potasio dibásico (0,70 g); Fosfato de Potasio monobásico (0,70 g); Glucosa (0,90 g); Nitrato de sodio (0,50 g); Sulfato de Amonio (0,50 g); Sulfuro de Magnesio (0,02 g).

El medio de cultivo utilizado para la reactivación y el crecimiento microbiano, fue el Agar Batata Dextrose (BDA) preparado de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes.

El BDA comercial (Sigma Aldrich©), utilizado para el crecimiento de hongos, está compuesto por: agar (15,0 g); dextrose (20,0 g); extracto de batata (4,0 g).

La solución indicadora de 2,3,5 Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC) fue preparada con agua destilada estéril en la concentración de 0,5%.

El medio de cultivo utilizado para los nematodos es el NGM, el cual contiene *Escherichia coli* como fuente de alimento. El mismo está compuesto por: NaCl (3 g); Agar (17 g); Peptona (2,5 g), H<sub>2</sub>O destilada (1L). Las sales: 1 M CaCl<sub>2</sub> (1 mL); 1 M MgSO<sub>4</sub> (1 mL); 1 M KPO<sub>4</sub> buffer (pH 6,0) (25 mL); 5mg/mL Colesterol (1 mL). Como antifúngico: Nistatina (12 500 UI), y antibiótico 100 mg/mL sulfato de estreptomicina (1 mL). La cepa de *E. coli* utilizada es OP50. Finalizado el preparo del medio de cultivo NGM, las placas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

Los microorganismos *E. coli* OP50 fueron cultivados en medio Luria Bertani líquido, que está compuesto por: Triptona (0,5 g); Extracto de levadura (0,25 g); NaCl (0,25 g) y H<sub>2</sub>O (50 mL).

El tampón M9 utilizado en *C. elegans* está compuesto por:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3,0 g);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6,0 g); NaCl (5,0 g);  $\text{H}_2\text{O}$  (1000 mL);  $\text{MgSO}_4$  (1 mL), con Ph 7.

Para la preparación de la solución stock del medicamento (Etinilestradiol/Levonorgestrel), se utilizó Dimetilsulfóxido 0,5 % (DMSO) como solvente de dilución. Fue preparada una solución madre para el medicamento, conteniendo 50 mg/L del compuesto. Para esto, el mismo fue triturado y disuelto en el solvente mencionado. Posteriormente la solución fue almacenada en refrigerador y diluida conforme necesario.

### 5.3 Preparación de los organismos biológicos

#### 5.3.1 Climatización, Exposición Al Medicamento Y Ensayo De Viabilidad Celular Del Microorganismo

Hasta el momento de su uso, el hongo FAR 03, se encontraba almacenado mediante la técnica de congelamiento en medio líquido con 20% (v/v) de glicerol estéril en agua. Consecuentemente, la misma fue asépticamente reactivada con 48 horas de antelación a su uso. La reactivación se llevó a cabo por transferencia de porciones de micelio a placas conteniendo medio BDA. Los hongos fueron incubados durante 72 h a 28°C hasta observar crecimiento micelial.

La exposición del microorganismo al medicamento en estudio se realizó siguiendo lo descrito por Grignet (2022). El medicamento utilizado y la concentración del mismo se escogieron teniendo en cuenta las grandes cantidades utilizadas en la población, la tasa de liberación en el medio ambiente y la persistencia ecológica de estos medicamentos basados en la literatura.

El microorganismo reactivado fue incubado en medio mínimo (MM), con adición de 0,5 g/L de glucosa (IVSHINA *et al.*, 2019) y enriquecido con una solución en la concentración final de 10 mg\*L del medicamento.

En el ensayo de viabilidad celular se utilizó el indicador TTC mediante la metodología descrita por Moussa y colaboradores (2013), en la cual, en la presencia de hongos y bacterias, el TTC es reducido a formazán roja, indicando la actividad y viabilidad celular.

Para la cepa de hongo en estudio, se utilizaron tubos estériles con tapa, conteniendo 3 mL de MM, 1 disco de 5 mm de diámetro del agar con el hongo reactivado y 600  $\mu\text{L}$  de la solución del medicamento, siguiendo lo realizado por Grignet (2022). Los tubos fueron incubados por 48 h en el *shaker* a 28 °C y agitación constante de 150 rpm. Tras este periodo,

se adicionó 300  $\mu$ L de la solución de TTC 0,5 % y los frascos fueron incubados por un mínimo de 2 horas en el *shaker* sobre las mismas condiciones.

Para esta prueba también se realizó un control positivo compuesto por el medio MM + el microorganismo y, un control negativo, agregando solamente la solución del medicamento, además del blanco conteniendo solamente el medio MM.

### 5.3.2 Cultivo, Manutención, Almacenamiento Y Sincronización De *C. elegans*

Una alícuota de las bacterias *E. coli* OP50, ya crecidas, fueron asépticamente introducidas al medio Luria. Las mismas, se dejaron crecer por 8 horas en estufa a 36-37 °C. Seguidamente, quedó preparada para ser aplicada en las placas NGM.

La transferencia de los gusanos al medio NGM se realizó por medio de repiques. Para esto, fue retirado un pedazo de placa antigua conteniendo *C. elegans* y colocado en una nueva placa a temperatura ambiente de manera que los gusanos posean espacio y alimento suficiente para desarrollarse. Para su almacenamiento, fueron guardadas en la oscuridad, en incubadoras a 20 ° C hasta su uso.

Para la sincronización de los *C. elegans*, los gusanos adultos con huevos fueron lavados con agua y transferidos para tubos Falcon. Después fueron centrifugados a 2500 rpm por 2 min y retirado el sobrenadante, dejando 2mL. Fue vertida la solución de sincronización, llamada de solución *bleaching*, la cual está compuesta por: Hipoclorito de sodio (1,5 mL); 1 M Hidróxido de sodio (0,250 mL); Agua destilada (3,250 mL). Los animales fueron expuestos, con agitación, por un periodo de 3-7 minutos hasta observar en el microscopio la expulsión de los huevos (GARDNER; ROSELL; MYERS, 2013). A continuación, los huevos restantes fueron lavados con tampón M9. Se llevó a centrifugación a 2500 rpm por 2 min, el sobrenadante fue retirado dejando 2 mL de solución. Este procedimiento se repitió 3 veces.

Los huevos resistentes al tratamiento fueron colocados en placas de Petri conteniendo tampón M9 por 12 h, en ausencia de alimento (CALAND, 2019). Una vez que los huevos alcanzaron la etapa L1, aproximadamente 12 horas después, se procedió a su uso para las pruebas (ALCARAZ GARCETE, 2022).

### 5.4 Recuperación del anticonceptivo metabolizado por hongos tolerantes (AMHT)

Para realizar la extracción del anticonceptivo metabolizado por los hongos tolerantes (AMHT) la cultura fúngica fue llevada a centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos (THI MINH LE *et al.*, 2019). El sobrenadante se traspasó a un tubo Falcon de 15 mL con tapa,

previamente esterilizado, el cual permaneció en heladera hasta su uso. El medio de cultivo a recuperar del tratamiento con hongos se denominó de la siguiente manera:

- AMHT<sub>FAR 03</sub>: anticonceptivo metabolizado por el hongo FAR 03.

### 5.5 Exposición del AMHT en *C. Elegans*

Para el primer grupo de exposición, aproximadamente 1000 gusanos en etapa larval L1 fueron colocados en cada tubo *Eppendorf* y posteriormente fue vertida la muestra de AMHT, sin sustrato, por un periodo de 1 h. Finalizada la exposición, los *C. elegans* fueron lavados 3 veces con el tampón M9 de manera a retirar restos de la muestra. Finalmente, aproximadamente 100 gusanos expuestos fueron trasladados a placas con NGM enriquecidas con *E. coli* y tras un periodo de 24 horas de incubación, se inició con la evaluación de los resultados. También fueron realizados un control M9, un control MM, un control DMSO y un grupo de exposición al medicamento anticonceptivo en estudio, como especificado en la tabla 2. Para el grupo anticonceptivo, se agregó la solución madre del medicamento, previamente preparado, visando respetar la concentración de 10 mg\*L establecido por Grignet (2022). En relación al control DMSO, la cantidad de compuesto se utilizó de manera a no alterar la concentración a la que se expuso al microorganismo.

**Tabla 2 - CONDICIONES DE TRATAMIENTO PARA TODOS LOS GRUPOS EXPERIMENTALES**

<b>Grupos experimentales</b>	<b>Condiciones de tratamiento</b>
<b>Control M9</b>	<i>C. elegans</i> + Tampón M9
<b>Control MM</b>	<i>C. elegans</i> + Medio Mínimo
<b>Control DMSO 0,5 %</b>	<i>C. elegans</i> + DMSO 0,5%
<b>Anticonceptivo</b>	<i>C. elegans</i> + Etinilestradiol 30 µg + Levonorgestrel 150 µg
<b>AMHT</b>	<i>C. elegans</i> + AMHT <sub>FAR 03</sub>

Leyenda: AMHT: anticonceptivo metabolizado por el hongo FAR 03.

Fuente: la autora.

Para la exposición en etapa larval L1, sin lavado, los gusanos pasaron por la misma metodología de exposición previamente descrito, a diferencia de que, los mismos no pasaron por la etapa de lavado tras la exposición. Por lo tanto, aproximadamente 100 gusanos, fueron directamente trasladados a placas con NGM enriquecidas con *E. coli* tras la exposición, por separado, del anticonceptivo, el AMHT y los controles (Tabla 2). De la misma manera, pasada las 24 h, se inició con la evaluación de resultados.

En relación a la exposición en etapa larval L4, gusanos en L1, derivados de la sincronización, fueron primeramente dejados crecer en placa con NGM enriquecidas con *E. coli*. Tras un periodo aproximado de 40-48 h, al observar que los mismos se encontraban en etapa larval L4, fueron colocados aproximadamente 1000 gusanos en cada tubo *Eppendorf*, siguiendo los grupos de experimentación descritos. Posteriormente fue vertida la muestra de AMHT correspondiente, sin sustrato, por un periodo de 1 h. Tras la exposición, aproximadamente 100 gusanos fueron nuevamente trasladados a placas con NGM enriquecidas con *E. coli*, sin previo lavado de la muestra. Luego de 10 minutos de adaptación, se realizaron los ensayos de locomoción y latidos faríngeos en los gusanos tratados. Los ensayos de supervivencia, desarrollo y huevos en útero se realizaron después de 24 h de la exposición.

Para todas las exposiciones mencionadas, fueron realizadas 3 repeticiones.

## 5.6 Efectos de los AMHT en *c. Elegans*

### 5.6.1 Supervivencia

Los grupos experimentales fueron evaluados 24 horas después de los tratamientos. Se realizó el conteo de gusanos vivos y muertos por medio de toques con un asa o alambre de todos los gusanos presentes en cada grupo. Los gusanos con capacidad de emitir

una respuesta al estímulo, fueron considerados vivos. Por otro lado, aquellos que no presentaron respuesta alguna, fueron considerados muertos (ARANTES *et al.*, 2016). Fueron realizadas 3 repeticiones para todas las placas evaluadas.

### 5.6.2 Capacidad De Desarrollo

La capacidad de desarrollo fue evaluada por la ocurrencia de las etapas larvales L1, L2, L3 y L4, adultos o adultos con huevos, en todos los gusanos presentes en las placas. Las distintas etapas de desarrollo se analizaron mediante la observación de la vulva, el tamaño de los gusanos y la presencia de huevos en el útero.

Para todas las placas conteniendo *C. elegans* tratados en etapa larval L1, la capacidad de desarrollo se analizó a las 48 y 72 h tras la exposición. Las características observadas fueron comparadas con la capacidad de desarrollo del control. En relación a los gusanos expuestos en etapa larval L4, se realizó un único análisis de desarrollo habiendo pasado 24 h del tratamiento.

Para todos los nematodos tratados, tanto en L1 como en L4, se realizaron 3 repeticiones del análisis.

### 5.6.3 Locomoción

Para el análisis de locomoción, las placas conteniendo gusanos tratados fueron lavadas con tampón M9 y el líquido fue traspasado a tubos *Eppendorf* diferenciados por grupo de exposición. Seguidamente, los animales fueron lavados 3 a 4 veces con tampón M9 hasta observar ausencia de turbidez en el medio, desde que, por su naturaleza quimiotáctica, los gusanos deben estar libres de bacterias o cualquier partícula que pueda interferir en el nado. A continuación, fueron transferidos a placas Petri de 60 mm de diámetro en presencia de tampón y tras una adaptación de 5 minutos se cuantificó el número de *trashes* por gusano en un periodo de 20 segundos, con un total de 3 mediciones por animal. La cuantificación de *trashes* consiste en observar la contracción muscular causada por la movilización de los gusanos. Esta contracción provoca una curvatura en el cuerpo de los mismos. Para este ensayo, fueron analizados un total de 5 gusanos por placa.

Todos los ensayos de locomoción se realizaron en gusanos adultos. De manera que, en los *C. elegans* expuestos a tratamiento en L1, dicho comportamiento se analizó aproximadamente a las 48 h del tratamiento. Sin embargo, en los gusanos tratados en L4, el análisis de locomoción se realizó inmediatamente después de la exposición, desde que, los

gusanos pueden pasar de etapa L4 tardía a adulto joven en cuestión de horas (ALCARAZ GARCETE, 2022).

#### 5.6.4 Latidos Faríngeos

Los gusanos fueron analizados por microscopía óptica por medio del conteo de los latidos faríngeos en un intervalo de 10 segundos en presencia de medio de cultivo NGM alimentadas con *E. coli* (WU *et al.*, 2019). Este ensayo fue realizado en gusanos en etapa larval L4, por lo que, los gusanos tratados en L1 fueron evaluados aproximadamente 40 h tras la exposición. Por otro lado, los nematodos expuestos en L4 fueron evaluados inmediatamente después de recibir el tratamiento. En todos los grupos de exposición (L1, L1 sin lavado y L4) se analizaron 5 gusanos por placa con un total de 3 mediciones por animal, por lo que el valor final analizado estadísticamente corresponde a la media de las 3 mediciones.

Fueron realizados 3 repeticiones para todas las placas evaluadas.

#### 5.6.5 Número De Huevos En El Útero

Fue contabilizada la cantidad de huevos presentes en el útero de los *C. elegans* adultos para determinar el efecto del AMHT y el medicamento en la reproducción de los mismos. Para esto, los gusanos adultos con huevos fueron trasladados a placas de Petri y expuestos a dos gotas de una solución de lisis alcalina, previamente preparada. La misma está compuesta por: NaOH 10M (2,5 mL); NaClO 2% (5mL), hasta observar en el microscopio la expulsión de los huevos. Seguidamente, se procedió al conteo de los mismos.

La evaluación de la cantidad de huevos presente en el útero de los gusanos tratados en etapa larval L1 se evaluaron al cabo de 72 h de haber sido expuestos a los tratamientos. Por otro lado, los gusanos tratados en etapa L4 fueron evaluados tras un periodo de 24 h.

Un total de 5 gusanos fueron evaluados por placa, para cada grupo experimental.

#### 5.7 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando *GraphPad Prism* v. 8 para Windows (GRAPHPAD SOFTWARE, 2022). Los resultados se representaron como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de tres experimentos individuales. Se utilizó ANOVA

unidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey para comparar grupos. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Reactivación y ensayo de ttc en la cepa fúngica (far 03)

La cepa fúngica en estudio (FAR 03) fue reactivada siguiendo lo realizado por Grignet (2022), teniendo en cuenta los cuidados de asepsia y esterilidad requeridos para muestras microbiológicas. Una vez observado el crecimiento de micelios tras 48 h de incubación, se procedió a evaluar la tolerancia del mismo hacia el medicamento de clase terapéutica hormonal Etinilestradiol/Levonorgestrel. Posterior a esto, fue utilizado sales de tetrazolio (TTC) para garantizar la viabilidad celular de los hongos, basado en el trabajo previo realizado por Grignet (2022).

Las sales de tetrazolio permiten medir la actividad respiratoria asociada a la cadena transportadora de electrones. Estas sales presentan la ventaja de ser reducidas por la mayoría de los sistemas de deshidrogenasas, y de requerir corto periodos de tiempo para su reducción y consecuente cambio de color (GABRIELSON *et al.*, 2002).

El hongo (FAR 03) fue evaluado en presencia del medicamento previamente mencionado en una concentración de 10 mg\*L, en el cuál fue posible observar la coloración rosa, indicando actividad y viabilidad celular.

Según resultados obtenidos en el trabajo de Grignet (2022), el hongo FAR 03 fue uno de los microorganismos con mayor estrategia de sobrevivencia al medicamento tanto de clase hormonal, como otras clases, el cual según alega la misma, puede ser más versátil en sus mecanismos de resistencia y tal vez de retención/biodegradación de estos medicamentos.

### 6.2 Recuperación del AMHT

Para la recuperación del anticonceptivo metabolizado por hongos tolerantes (AMHT), se siguió la metodología basada en (CHOWDHARY *et al.*, 2020). La centrifugación de la cepa fúngica se llevó a cabo bajo las condiciones de 6000 rpm por 10 minutos y se obtuvo el extracto correspondiente.

### 6.3 Ensayos de comportamiento y desarrollo en *c. Elegans*

La exposición del AMHT fue realizada en 3 condiciones distintas con los gusanos. Las mismas fueron expuestas en etapa larval L1, L4 y desde L1 hasta adultos con huevos.

Esto se realizó con el fin de comparar los comportamientos y el desarrollo de *C. elegans* al ser expuestos en distintos periodos de su vida. Recordando que el ciclo de vida de *C. elegans* comprende la etapa embrionaria, cuatro etapas larvales (L1-L4) y la edad adulta. El final de cada etapa larvaria se marca con una muda en la que se sintetiza una nueva cutícula específica de la etapa y se desprende la anterior (CASSADA; RUSSELL, 1975). Como alegan Lints, Hall y Herndon (2010), las cutículas correspondientes a cada estadio larval difieren en la expresión de proteínas, en el número de capas que la componen, en el espesor y en la composición de las mismas. En base a esto, se decidió realizar la exposición en las etapas larvales mencionadas a modo de observar posibles efectos causados por las sustancias en estudio.

Por otro lado, por tratarse de un medicamento de clase hormonal anticonceptivo, surgió la hipótesis de observar el efecto del mismo en la formación de huevos en útero en los organismos hermafroditas. Según Antebi *et al.* (1997), la gonadogénesis, que comienza aproximadamente 7 horas después de la eclosión, se completa en la etapa L4. Así también, en la etapa L4/adulto, la producción de espermatozoides se detiene y las células germinales restantes continúan experimentando meiosis y diferenciación para generar exclusivamente ovocitos. A partir de ahí, las neuronas de puesta de huevos (VC y HSN) y los músculos sexuales, generados a partir de mioblastos sexuales, se asocian con estas estructuras para formar el aparato de puesta de huevos (GREENWALD, 1997).

Para el análisis de resultados, primeramente, fue realizada una comparación estadística de los valores obtenidos únicamente por los grupos controles (cDMSO, cMM y cM9) para todos los ensayos de comportamiento y desarrollo de los gusanos. Los datos estadísticos no mostraron diferencia significativa entre los tres grupos controles, lo que indica que los reactivos utilizados no interfirieron en los resultados del experimento. A partir de esto, se decidió utilizar un único control, el tampón M9, para realizar las comparaciones estadísticas con el resto de los grupos experimentales (anticonceptivo y AMHT). Los gráficos correspondientes al análisis de los grupos controles se pueden observar en la sección de material suplementar 1.

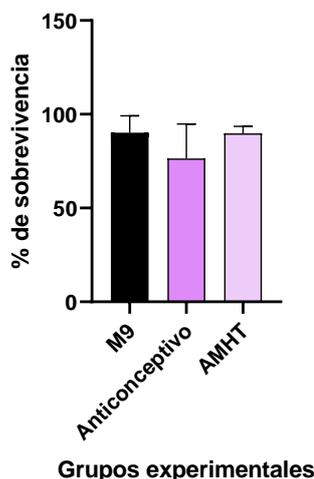
Para cada grupo de exposición, fueron realizadas tres repeticiones independientes de exposición, así como en la evaluación de resultados.

## 6.4 Supervivencia

Para el presente trabajo, la totalidad de los gusanos presentes en cada placa fueron evaluados 24 horas después de la exposición a los distintos grupos experimentales y fue realizado el conteo de animales vivos y muertos presentes en cada una de las 3 exposiciones.

Según los valores obtenidos por la comparación múltiple de Tukey, el grupo de exposición en L1 con lavado, tuvo una media de 90, 76 y 89 % de supervivencia para los grupos control M9, anticonceptivo y AMHT, respectivamente, representado en el gráfico 1. Estos resultados indican que, al cabo de 24 horas, la exposición de los gusanos a los grupos experimentales no causó un efecto negativo sobre la supervivencia de los gusanos.

**Gráfico 1 - PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA EN *C. ELEGANS* EN EXPOSICIÓN L1 FRENTE AL ANTICONCEPTIVO Y AMHT**



Análisis de supervivencia en los gusanos tratados en L1 con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, 24 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

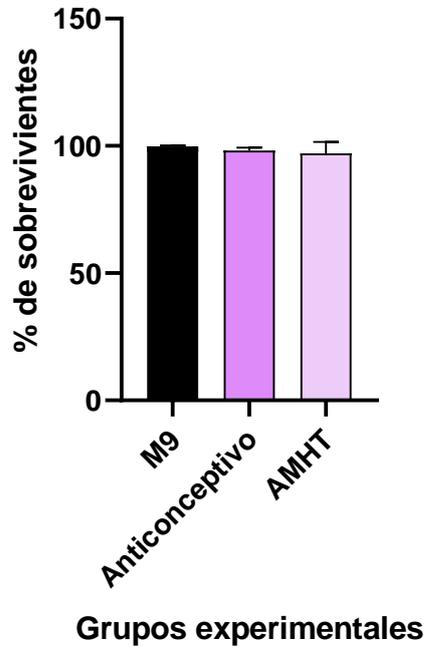
Fuente: la autora.

Los ensayos de supervivencia con *C. elegans* han sido herramientas clave para estudiar los procesos fisiológicos de los mismos, incluyendo el envejecimiento, la resistencia al estrés y la inmunidad. Una ventaja notable de los *C. elegans* para este tipo de ensayos es que poblaciones isogénicas sincronizadas son fáciles de preparar pues el nemátodo generalmente existe como un hermafrodita capaz de autofertilizarse y producir cientos de progenies (GEMS; RIDDLE, 1996).

Así como los resultados obtenidos en exposición en L1, en las exposiciones en etapa larval L4 y L1 sin lavado, analizados 24 h después del tratamiento, el porcentaje de supervivientes tras el tratamiento de los grupos experimentales no presentó variabilidad

significativa entre los grupos analizados para ( $P < 0,05$ ). Estos resultados están expuestos en los gráficos 2 y 3.

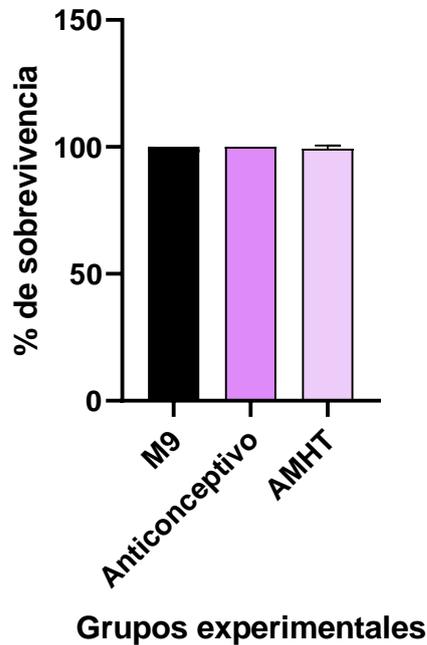
**Gráfico 2** - PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA EN *C. ELEGANS* EN EXPOSICIÓN L1, SIN LAVADO, FRENTE AL ANTICONCEPTIVO Y AMHT



Análisis de supervivencia en los gusanos tratados en L1, sin lavado, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, 24 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

**Gráfico 3 - PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA EN *C. ELEGANS* EN EXPOSICIÓN L4 FRENTE AL ANTICONCEPTIVO Y AMHT**



Análisis de supervivencia en los gusanos tratados en L4 con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, 24 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

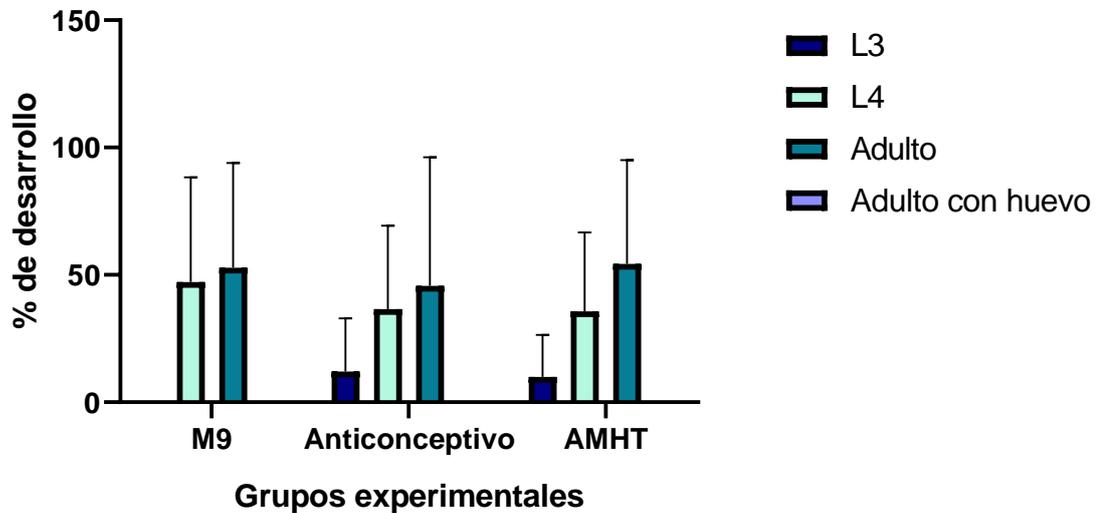
Fuente: la autora.

### 6.5 Capacidad de desarrollo

Las etapas larvales evaluadas a las 48 h de exposición fueron de L3, L4, adultos y adultos con huevos. Por otro lado, a las 72 horas de exposición, los grupos encontrados fueron de L4, adultos y adultos con huevos.

Los resultados obtenidos en relación al desarrollo de los gusanos, no presentaron diferencia significativa para los grupos anticonceptivos y AMHT en relación al control M9 o entre los grupos, a las 48 h, presentadas en el gráfico 4 y 5, así como a las 72 h de exposición, presentadas en el gráfico 6 y 7, en ninguna de las exposiciones realizadas en L1.

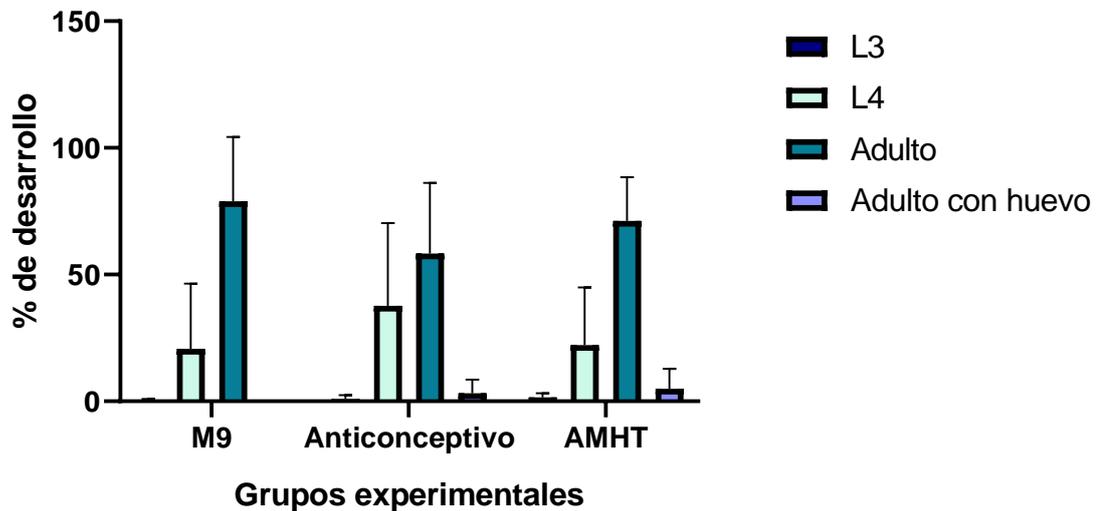
**Gráfico 4 - PORCENTAJE DE DESARROLLO DE LOS *C. ELEGANS* 48 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN ETAPA LARVAL L1.**



Efecto en el desarrollo de los gusanos tratados en L1 con el medicamento anticonceptivo y el AMHT 48 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

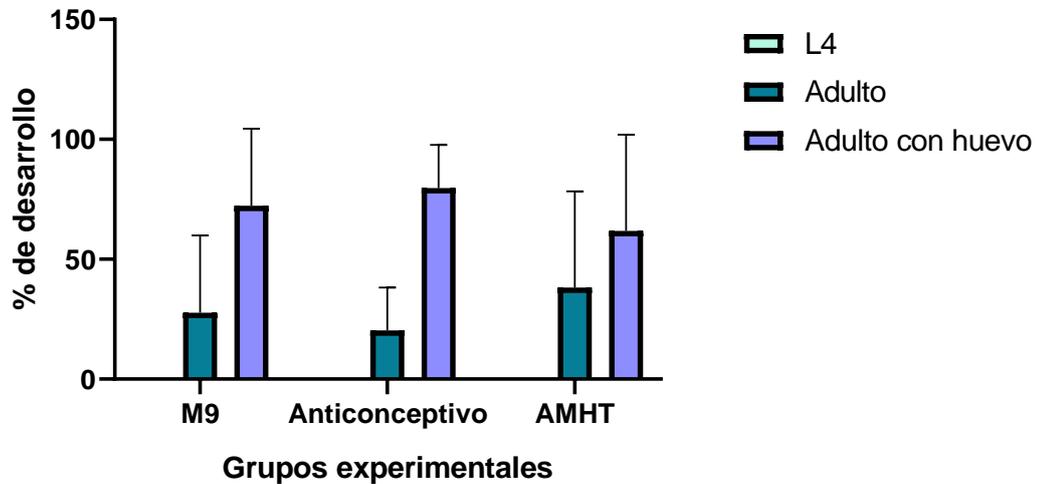
**Gráfico 5 - PORCENTAJE DE DESARROLLO DE LOS *C. ELEGANS* 48 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN ETAPA LARVAL L1, SIN LAVADO.**



Efecto en el desarrollo de los gusanos tratados en L1, sin lavado, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT 48 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

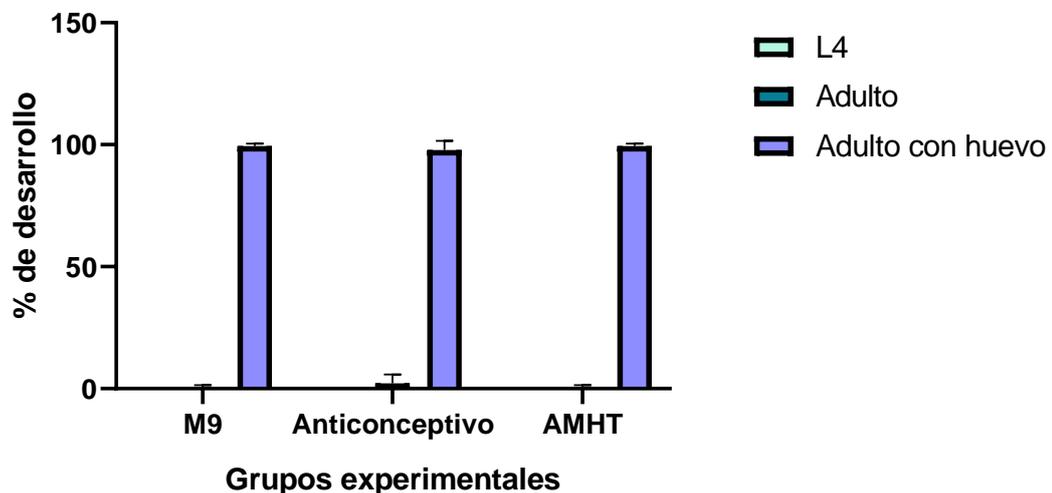
**Gráfico 6 - PORCENTAJE DE DESARROLLO DE LOS *C. ELEGANS* 72 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN ETAPA LARVAL L1**



Efecto en el desarrollo de los gusanos tratados en L1 con el medicamento anticonceptivo y el AMHT 72 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

**Gráfico 7 - PORCENTAJE DE DESARROLLO DE LOS *C. ELEGANS* 72 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN ETAPA LARVAL L1, SIN LAVADO.**



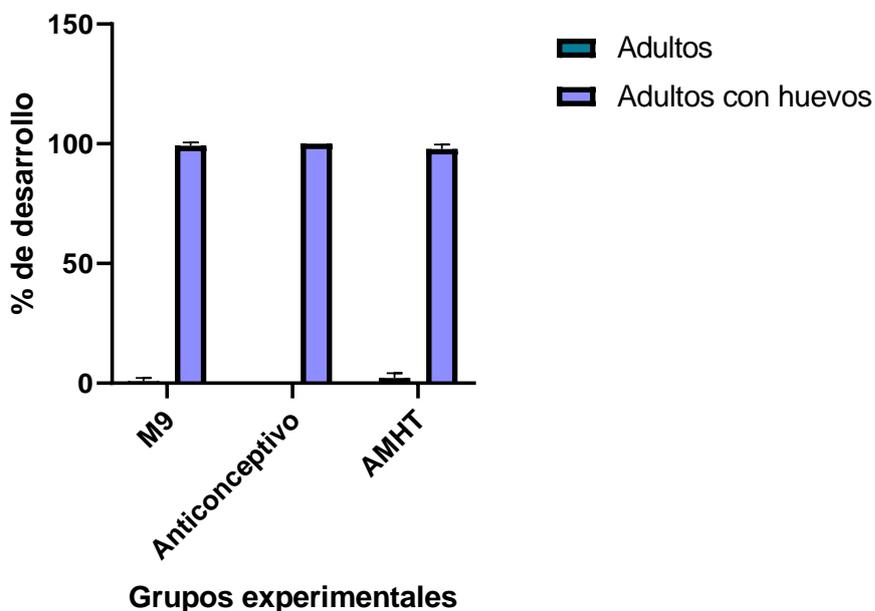
Efecto en el desarrollo de los gusanos tratados en L1, sin lavado, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT 72 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

De la misma manera, en el grupo L4, no se observaron diferencias de desarrollo al momento de evaluación (24 h después del tratamiento), como observado en el gráfico 8. Esto indica que el medicamento en estudio, así como el medicamento metabolizado,

bajo esas condiciones, no afectaron negativamente la capacidad de desarrollo de los nematodos durante el periodo de análisis.

**Gráfico 8 - PORCENTAJE DE DESARROLLO DE LOS *C. ELEGANS* 24 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN ETAPA LARVAL L4.**



Efecto en el desarrollo de los gusanos tratados en L4, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT 24 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

El ciclo de vida normal de *C. elegans* de tipo salvaje a 22°C sigue aproximadamente el siguiente esquema: L1, a las 9 h (incluyendo la etapa embrionaria), L2 a las 21 h, L3 a las 29 h, L4 a las 37 h, adulto joven a las 48 h y adulto maduro a las 55 h (LI *et al.*, 2014). Cuando las condiciones ambientales no son favorables para el crecimiento, las larvas L2 pueden llevar a cabo un ciclo de vida diferente y mudar a un estadio larval alternativo llamado larva “dauer”. Estos pueden sobrevivir varias semanas en dicho estadio sin alimentarse y con ausencia de desarrollo hasta que las condiciones vuelvan a ser favorables, para continuar su desarrollo como larva L4 (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

Estos valores de desarrollo pueden variar en relación a distintos parámetros, incluyendo la temperatura. A temperaturas más bajas el ciclo de vida se retrasa (15°C) y a temperaturas más altas (25°C) se acelera el ciclo de vida (DEVANEY, 2006). Estas alteraciones de desarrollo de los gusanos en relación a la temperatura fueron visibles durante la realización de este trabajo. En días más calurosos, los gusanos se encontraban en etapas larvales más avanzadas a comparación de días más fríos, en el mismo periodo de tiempo. Más información

referente al desarrollo de los gusanos a diferentes temperaturas se encuentra en la tabla 1 del material suplementar 2.

Debido a esta variabilidad dependiente del clima, se considera que los resultados obtenidos para el ensayo de desarrollo no pueden ser completamente confiables, desde que, este parámetro dificulta la percepción real de los resultados causados únicamente por la exposición del grupo anticonceptivo y AMHT. Visando lo mencionado, serían necesarios más repeticiones para los ensayos de desarrollo para concluir con certeza que los compuestos evaluados no generan ningún tipo de efectos sobre los *C. elegans*.

## 6.6 Locomoción

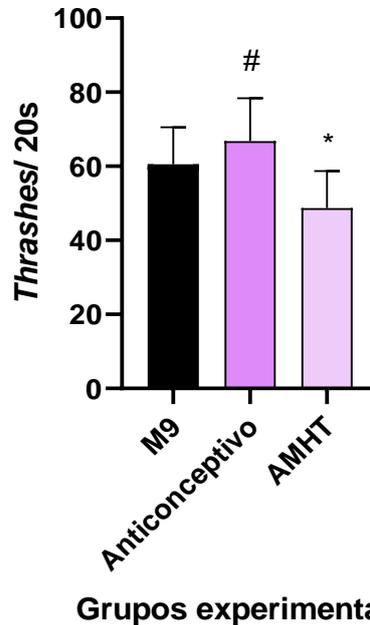
Los comportamientos de locomoción son un indicador de evaluación rápida que refleja si el sistema nervioso de los gusanos está dañado y se ha demostrado que es sensible a la toxicidad química (ZHANG; GAO; CHEN, 2022).

Para el análisis de locomoción, fueron evaluados 5 gusanos por grupo experimental para todas las exposiciones, cuando los mismos alcanzaron la etapa adulta (2 a 4 días aproximadamente). La cantidad de *thrashes* se midió en un período de 20 segundos, con un total de 3 veces por gusano.

Según el análisis estadístico realizado, las medias de los resultados obtenidos para el ensayo de locomoción mostraron diferencia significativa en 2 de los 3 grupos de exposición.

Para la exposición en etapa larval L1, con lavado, el grupo control M9 fue analizado aproximadamente 48 h después del tratamiento, el mismo presentó una media de 60 *thrashes* en 20 segundos, mientras que en los grupos anticonceptivo y AMHT, evaluados en el mismo periodo de tiempo, los valores fueron de 67 y 49, respectivamente. Los resultados muestran una disminución en la locomoción de los gusanos expuestos al grupo anticonceptivo metabolizado (AMHT), en una cantidad del 18% ( $p < 0.01$ ) en comparación al control M9 y 27% ( $p < 0.0001$ ) en relación al grupo anticonceptivo. Las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey también mostraron que no hubo una diferencia significativa (ns) entre los valores obtenidos para el grupo control M9 y el grupo anticonceptivo. Tales resultados están expuestos en el gráfico 9.

**Gráfico 9** – NÚMERO DE *THRASHES* EN 20 S EN *C. ELEGANS* FRENTE A LA EXPOSICIÓN DEL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN EXPOSICIÓN L1.

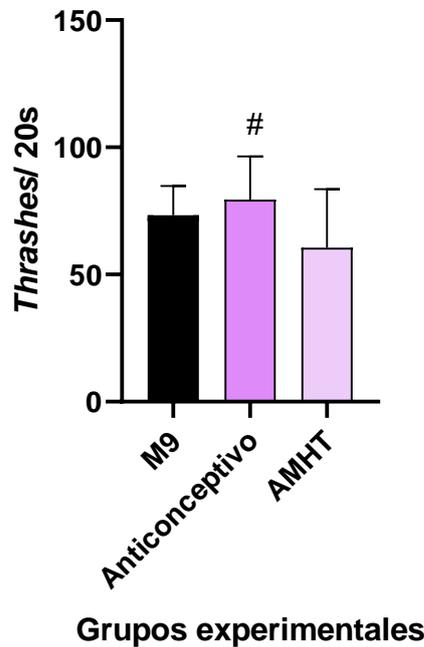


Efecto en la locomoción de los gusanos tratados en L1 con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, aproximadamente 48 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos AMHT y el control M9 y el grupo anticonceptivo con respecto al grupo AMHT, mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. #: diferente del AMHT; \*: diferente del control M9. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

En lo que respecta al grupo de exposición en L4, los valores para locomoción, analizados aproximadamente 10 minutos después del tratamiento, fueron de 73, 79 y 61 para los grupos cM9, anticonceptivo y AMHT, respectivamente. En los gusanos expuestos al grupo AMHT, se observó una disminución en la natación de los gusanos en un 23% en relación al grupo anticonceptivo ( $p < 0.016$ ). Por otro lado, no fue observada diferencia significativa en los grupos anticonceptivo y AMHT en relación al control M9, como revelado en el gráfico 10.

**Gráfico 10** - NÚMERO DE *THRASHES* EN 20 S EN *C. ELEGANS* FRENTE A LA EXPOSICIÓN DEL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN EXPOSICIÓN L4



Efecto en la locomoción de los gusanos tratados en L4 con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, analizado aproximadamente 10 min después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos AMHT y el grupo anticonceptivo, mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. #: diferente del AMHT. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

La disparidad de resultados obtenidos entre los gusanos expuestos a distintas etapas larvales muestra la diferencia de tolerancia de los *C. elegans* a cambios externos en relación a la etapa de desarrollo. Siendo entonces, la etapa L1 más susceptible a alteraciones en relación a la etapa L4. Este raciocinio puede estar relacionado al hecho de que de las 8 clases de neuronas motoras (DAn, DBn, VAn, VBn, VCn, ASn, VDn, and DDn), en el cordón ventral del adulto hermafrodito, 5 (VAn, VBn, VCn, ASn, VDn) son generados al final de la etapa larval L1 (CHALFIE; WHITE; WOOD, 1988; SULSTON, 1976; SULSTON; HORVITZ, 1977).

Esta teoría también se basa en un estudio realizado por Hernando (2013) en donde fueron explorados los distintos niveles de receptores involucrados en la coordinación de la locomoción en los nematodos *C. elegans*. Dos receptores específicos, AChR y UNC-49, ambos miembros de la familia de receptores “Cys-loop” son conocidos por estar involucrados en la contracción muscular y la locomoción de nematodos. Con esto, los mismos han sido blanco de múltiples investigaciones clínicas como dianas de fármacos. Para que ocurra la

locomoción en los gusanos, los músculos de la pared del cuerpo reciben inervación de las neuronas motoras colinérgicas (excitatorias) y GABAérgicas (inhibitorias). La acetilcolina (ACh), sustancia química con función mensajera, liberada desde las neuronas motoras estimula la contracción muscular sobre un lado del cuerpo, y simultáneamente activa una neurona motora inhibitoria que se proyecta hacia el lado opuesto del cuerpo y libera GABA, el cual relaja los músculos.

En base a esto, se puede deducir que el grupo AMHT, el cual contiene el anticonceptivo metabolizado, pudo haber interferido en las neuronas motoras generadas al final de la etapa L1 al momento de exposición, disminuyendo así, el número de *thrashes* de los gusanos cuando comparados con el control M9 y con el grupo anticonceptivo.

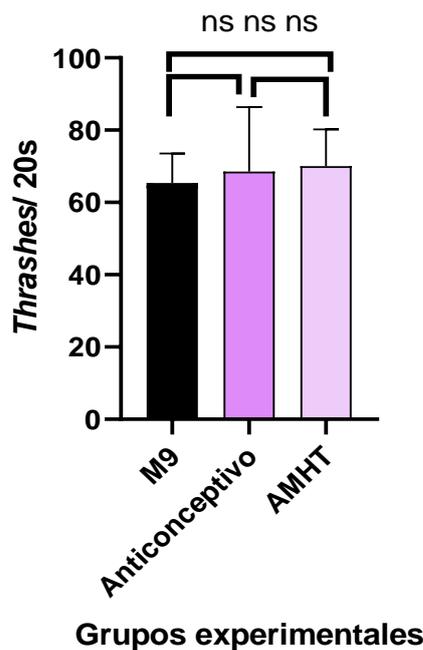
Resaltando que la hormona anticonceptiva no causó variación significativa en los gusanos, cuando fueron expuestos en etapa L1 y evaluados en gusanos adultos, en relación al cM9, sin embargo, cuando el mismo fue metabolizado por el hongo (AMHT) causó efectos que pueden o no ser considerados negativos en los *C. elegans*. Esto puede generar una incógnita en relación a la confiabilidad de utilizar el hongo en procesos biotecnológicos, como el de biorremediación, pudiendo el mismo generar una toxicidad distinta al que generaría el anticonceptivo por sí solo. Esta alteración también se hizo visible con la disminución del número de *thrashes* en el grupo AMHT en comparación con el grupo medicamento cuando fueron expuestos en L4. Y de la misma manera que en L1, los gusanos expuestos únicamente al anticonceptivo no sufrieron alteraciones relevantes cuando comparados con el control, enfatizando la diferencia de riesgo de los organismos biológicos al ser expuestos a ambas sustancias químicas.

A pesar de que los mecanismos por el cual el medicamento hormonal en estudio, disminuya el número de *thrashes* en los gusanos, no se encuentre completamente explicado, existen estudios que demuestran que el tratamiento de los nematodos en etapa larval L4, así con en L1, puede producir un desequilibrio hormonal que conduciría a un retraso en el desarrollo de esta última muda larvaria, ya que ha sido demostrado que esta etapa está regulada con precisión por señales neuroendocrinas (MOYA *et al.*, 2022; RUSSEL; FRAND; RUVKUN, 2011). Con todo esto, serían necesarios otros estudios y mayor cantidad de repeticiones que confirmen esta suposición y permitan dilucidar el mecanismo específico que relacionen la disminución del movimiento locomotor de los gusanos con los receptores mencionados.

Por otro lado, en relación al grupo de exposición en L1, sin lavado, evaluado aproximadamente 48 h después del tratamiento, el análisis estadístico mostró que no hubo

diferencias significativas de los grupos anticonceptivos y AMHT en relación al control M9 o entre sí, como mostrado en el gráfico 11. Esto puede deberse a una cuestión de adaptabilidad ambiental, puesto que, para este grupo, los gusanos fueron expuestos a la sustancia durante todo el periodo de análisis, es decir, desde L1 hasta adultos con huevos, lo que posibilita el hecho de que el organismo del gusano haya pasado por un proceso de adaptación hacia la sustancia expuesta y consecuentemente, aumente su capacidad de resistencia. Esta teoría se ve respaldada por Hilliard *et al.* (2004), los cuáles observaron que la estimulación química repetida en los nematodos *C. elegans*, condujo a una reducción reversible en la magnitud de respuesta a neuronas sensoriales, indicando adaptación dentro de la neurona ASH. En base a esto, no se descarta la posibilidad de que los *C. elegans* que fueron expuestos en L1, sin lavado, hayan podido pasar por un proceso similar de acondicionamiento.

**Gráfico 11** - NÚMERO DE *THRASHES* EN 20 S EN *C. ELEGANS* FRENTE A LA EXPOSICIÓN DEL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN EXPOSICIÓN L1, SIN LAVADO.



Efecto en la locomoción de los gusanos tratados en L1, sin lavado, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, aproximadamente 48 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. ns: no significativo. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

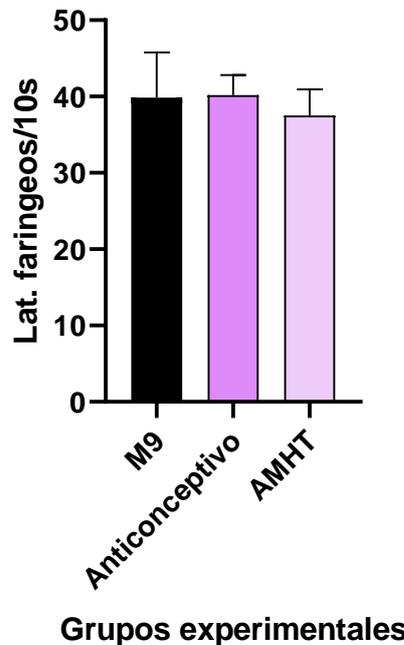
Fuente: la autora.

## 6.7 Latidos faríngeos

En este estudio, el ensayo de latidos faríngeos en exposición L1, con lavado, se evaluó aproximadamente 40 h después del tratamiento. En el mismo se obtuvo una media de

40, 40 y 37 para los grupos cM9, anticonceptivo y AMHT, respectivamente, como observado en el gráfico 12.

**Gráfico 12** – LATIDOS FARÍNGEOS CONTABILIZADOS EN 10 SEGUNDOS EN LOS *C. ELEGANS* FRENTE AL TRATAMIENTO DEL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN EXPOSICIÓN L1.

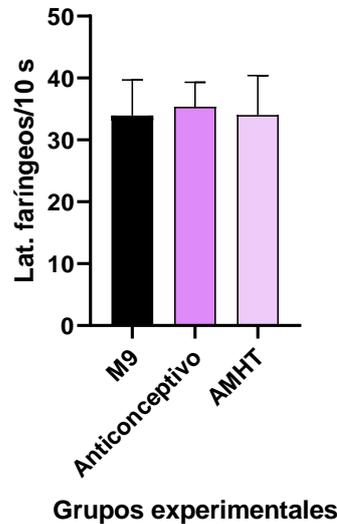


Efecto en los latidos faríngeos de los gusanos tratados en L1, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, aproximadamente 40 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

Para la exposición en L1, sin lavado, analizado en el mismo periodo de tiempo (40 h) y el grupo L4, analizado aproximadamente 10 minutos después de que se llevara a cabo el tratamiento, los valores obtenidos resultaron similares a los recién mencionados. Según el análisis comparativo de Tukey, no se observó un aumento o disminución del número de latidos faríngeos contabilizados en 10 segundos, en ninguna de las 3 exposiciones (L1, L1 sin lavado y L4) entre los grupos experimentales (cM9, Anticonceptivo y AMHT). Los gráficos correspondientes a los grupos de exposición L1, sin lavado y L4 se encuentran expuestos a continuación, gráficos 13 y 14, respectivamente.

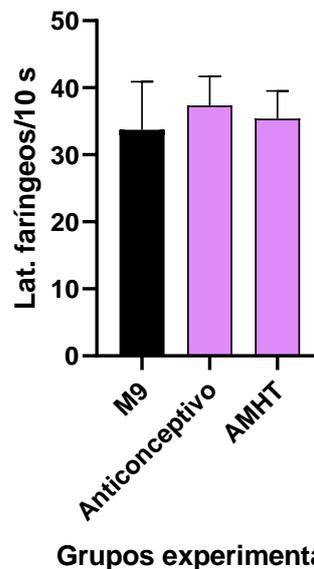
**Gráfico 13** - LATIDOS FARÍNGEOS CONTABILIZADOS EN 10 SEGUNDOS EN LOS *C. ELEGANS* FRENTE AL TRATAMIENTO DEL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN EXPOSICIÓN L1, SIN LAVADO.



Efecto en los latidos faríngeos de los gusanos tratados en L1, sin lavado, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, aproximadamente 40 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

**Gráfico 14** - LATIDOS FARÍNGEOS CONTABILIZADOS EN 10 SEGUNDOS EN LOS *C. ELEGANS* FRENTE AL TRATAMIENTO DEL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN EXPOSICIÓN L4



Efecto en los latidos faríngeos de los gusanos tratados en L4, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, analizado aproximadamente 10 min después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

Las comparaciones realizadas indican que los compuestos analizados no generaron alteraciones en el movimiento faríngeo de los gusanos, habiendo observado comportamientos normales en todos los gusanos analizados.

El nematodo *C. elegans* utiliza contracciones musculares rítmicas (bombeos) de la faringe, un órgano tubular de alimentación, para filtrar, transportar y triturar las partículas de los alimentos (BRENNER; RAIZEN; FANG-YEN, 2022).

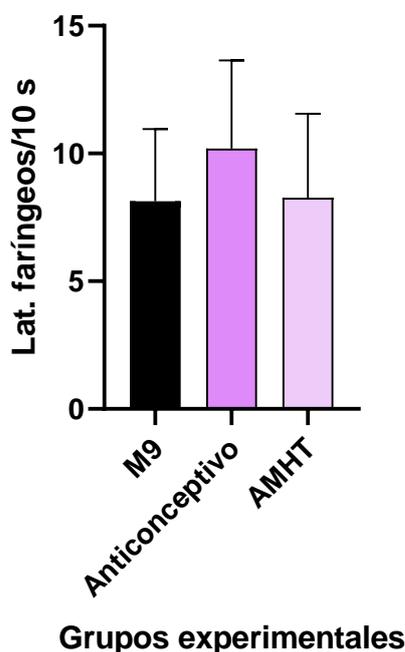
En estudios previos utilizando hormonas del tipo testosterona, se observó que los mismos podían alterar distintos patrones de comportamiento de los gusanos, incluida la tasa de bombeo faríngeo, el cual causaba un deterioro en dicho comportamiento en los individuos (GÁMEZ-DEL-ESTAL *et al.*, 2014).

A pesar de que las testosteronas pertenecen al mismo grupo de hormonas sexuales, en este trabajo no se observó ningún tipo de toxicidad del medicamento anticonceptivo o el metabolizado hacia el movimiento faríngeo de los nematodos *C. elegans*. Esto podría deberse al hecho de que, en el presente trabajo, se utilizó concentraciones y presentaciones distintas de las hormonas, en relación al trabajo mencionado de Gámez-del-Estal *et al.* (2014). En el mismo, la concentración de testosterona utilizada fue de 0,288 g/L, en forma de polvo puro. Sin embargo, en este estudio la concentración utilizada fue de 0,01 g/L, en forma de medicamento. Estas diferencias podrían ser las responsables por la cual existe divergencia entre los resultados. Se resalta la importancia de realizar otros experimentos alterando las concentraciones del medicamento o bajo el uso de compuestos puros de hormonas, entre otros, para determinar si existen diferencias en el latido faríngeo de los gusanos.

## 6.8 Número de huevos en el útero

A partir de los resultados obtenidos con la prueba de comparación múltiple de Tukey, el ensayo de número de huevos en el útero no presentó una diferencia significativa de los grupos anticonceptivo y anticonceptivo metabolizado (AMHT) en relación al control M9 o entre sí, para ninguno de los grupos de exposición. Aparentemente, los gusanos no sufrieron alteración en la producción de huevos ante la exposición de los compuestos test. A continuación, el gráfico 15 correspondiente al análisis del grupo de exposición en L1. Los gusanos pertenecientes a este grupo de exposición fueron evaluados 72 h después del tratamiento en relación a la formación de huevos en el útero.

**Gráfico 15** – NÚMERO DE HUEVOS EN EL ÚTERO DE LOS *C. ELEGANS* FRENTE A LA EXPOSICIÓN DEL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN ETAPA LARVAL L1.



Efecto en la formación de huevos de los gusanos tratados en L1, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, aproximadamente 72 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

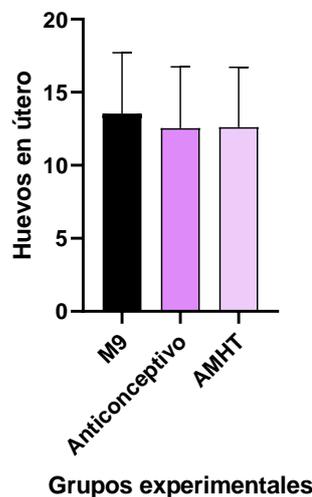
Fuente: la autora.

Un estudio realizado sobre la respuesta de *C. elegans* hacia hormonas esteroides de vertebrados mostraron que el estradiol (E2), una hormona del tipo esteroide estrogénica, tiene potencial similar al colesterol en los gusanos, apoyando su reproducción e incluso se observó que esta potencia aumenta con la dosis. Sin embargo, otras hormonas como la testosterona y el dietilestibestrol no mostraron el mismo potencial. En cambio, cuando el cultivo se realizó en presencia de colesterol, los 3 compuestos suprimieron la tasa de fecundidad en los gusanos (TOMINAGA *et al.*, 2003). Estos datos sugirieron que los gusanos tienen distintas capacidades de responder a distintos tipos de hormonas. No obstante, otro estudio también informó que el crecimiento de *C. elegans* es inhibido por E2 y otras hormonas sexuales de vertebrados, donde concluyeron que una variedad de hormonas de este tipo son inhibidores no específicos de la reproducción en nematodos (DROPKIN; LOWER; ACEDO, 1971). Este último indicó que la concentración de los químicos utilizados fue más de 100  $\mu\text{M}$ , mucho más alta que el trabajo realizado por Tominaga, *et al.* (2003), en donde utilizaron una concentración de 0,5-5  $\mu\text{M}$ . Con eso, los mismos concluyeron que el fenómeno observado en relación al apoyo

de la hormona E2 a la reproducción de los nematodos, puede indicar un efecto de dosis bajas en la fisiología de *C. elegans*.

Bajo este contexto, sería posible explicar los resultados obtenidos en el ensayo de número de huevos por gusano tras ser expuestos al medicamento en estudio y su respectivo metabolizado. Las concentraciones del medicamento utilizado en este trabajo fueron de 10 mg/L, lo que corresponde a 37,04  $\mu\text{M}$ , el cuál es un valor bastante menor a los 100  $\mu\text{M}$  de estradiol, considerado tóxico según Dropkin, Lower y Acedo (1971) Aun así, dicha comparación no es completamente certera teniendo en cuenta que en este trabajo no fue utilizado un compuesto puro, sino una sustancia medicamento con presencia de excipientes además del principio activo. Además, la aplicación del compuesto químico se dio por exposición en medio líquido y no presentes en placa, como en el trabajo de Tominaga *et al.* (2003). Estas diferencias también pueden ser causantes de la discrepancia entre los resultados, como observado en el gráfico 16, correspondiente a los valores obtenidos para el grupo de exposición en L1, sin lavado. Los mismos fueron evaluados en relación a la formación de huevos al cabo de 72 h de haber sido expuestos.

**Gráfico 16** - NÚMERO DE HUEVOS EN EL ÚTERO DE LOS *C. ELEGANS* FRENTE A LA EXPOSICIÓN DEL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN ETAPA LARVAL L1, SIN LAVADO.



Efecto en la formación de huevos de los gusanos tratados en L1, sin lavado, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, aproximadamente 72 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

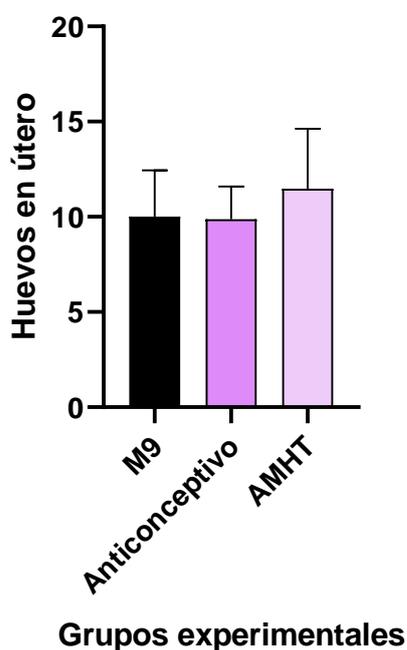
Fuente: la autora.

En base a esto, al haber utilizado una concentración relativamente baja, es posible que la exposición ante la misma esté más relacionada al factor de apoyo a la

reproducción que como posible toxicante. En el gráfico 17, es posible observar los valores de número de huevos en útero, obtenidos ante la exposición en etapa L4 y evaluados 72 h después de los tratamientos.

Otros análisis, aumentando la concentración del medicamento o bajo el uso de los principios activos puros también serían necesarios para verificar si el compuesto realmente no causa alteraciones en la reproducción de los gusanos.

**Gráfico 17** - NÚMERO DE HUEVOS EN EL ÚTERO DE LOS *C. ELEGANS* FRENTE A LA EXPOSICIÓN DEL ANTICONCEPTIVO Y AMHT EN ETAPA LARVAL L4.



Efecto en la formación de huevos de los gusanos tratados en L4, con el medicamento anticonceptivo y el AMHT, aproximadamente 72 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora

A pesar de los resultados obtenidos mediante los ensayos de comportamiento y desarrollo en los gusanos, en los cuáles, a grandes rasgos, no se observó un gran efecto negativo, no es posible concluir que tanto el medicamento anticonceptivo (Ethinilestradiol + Levonorgestrel) o el mismo al haber sido metabolizado por el hongo FAR 03, carecen de toxicidad al ser expuestos a organismos biológicos. La ausencia de toxicidad en los comportamientos no garantiza que no estén siendo afectadas vías moleculares de tales organismos. De hecho, un estudio realizado por Mimoto, *et al.* (2007), en el cual se analizaron receptores de hormonas nucleares (NHR) conocidos en *C. elegans*, se resalta un receptor *nhr-*

14, por su capacidad de interactuar y controlar la expresión génica en respuesta al estrógeno. Así también, en otro estudio realizado por Sun Jin y colaboradores (2012) se menciona la glicoproteína P (P-gp), el cual funciona con un transportador de unión de ATP y confiere resistencia a múltiples fármacos, afectando la absorción, distribución y eliminación de los mismos. En dicho estudio se encontró un aumento en la actividad ATPasa en células conteniendo la proteína P-gp de *C. elegans* ante la presencia de la hormona progesterona, lo cual respalda la hipótesis de la capacidad de los nematodos de disminuir los efectos negativos por medio de proteínas y receptores de membrana.

Estos estudios respaldan el hecho de que las hormonas del tipo progesterona o estrógeno podrían estar reaccionando molecularmente con las células de los *C. elegans* a pesar de ser imperceptibles en el desarrollo o el comportamiento de los mismos.

Otro punto muy importante a mencionar en relación a los resultados se debe a que, en este trabajo, se analizó la metabolización de un único microorganismo ante la exposición de un único medicamento. Según los resultados obtenidos por Grignet (2022), en el arroyo “Arroio Dourado” se encontraron múltiples hongos y bacterias capaces de sobrevivir ante la exposición de 5 clases distintas de medicamentos, entre las cuales el FAR 03, utilizado en este estudio, fue uno de los microorganismos que se mostró más tolerante, creciendo ante la presencia de 7 medicamentos distintos. Esto deja claro que los organismos biológicos presentes en el agua de dicho arroyo, están expuestos a una acción sinérgica de medicamentos metabolizados, entre otras cosas. Lo que deja espacio a continuar nuevos análisis de interacción medicamentosa en organismos modelos como *C. elegans*, como un indicador biológico para determinar si el agua de dicha localidad es realmente apta para uso y consumo de la población.

## 7 CONSIDERACIONES FINALES

- No se observó letalidad significativa en los nematodos al ser expuestos al medicamento anticonceptivo (Ethinilestradiol + Levonorgestrel) o al anticonceptivo tras ser metabolizado por un hongo tolerante en ninguno de los grupos de exposición, L1, L1 sin lavado y L4.
- Los compuestos químicos en análisis tampoco afectaron el desarrollo del ciclo de vida de los gusanos. Sin embargo, más estudios deben ser realizados para corroborar tales resultados pues la variación de temperatura vivenciadas en la ciudad donde se llevó a cabo la experimentación, deja en duda la percepción real de desarrollo de los *C. elegans*.
- El medicamento anticonceptivo no alteró la locomoción de los *C. elegans*, sin embargo, si se observó disminución en el número de *thrashes* cuando los mismos fueron expuestos al AMHT en etapa larval L1, con lavado y L4. El grupo de experimentación L1, sin lavado, no generó ninguna variación con respecto a la locomoción de los gusanos.
- Los comportamientos de latidos faríngeos y huevos en útero tampoco presentaron toxicidad aparente ante la exposición del medicamento anticonceptivo y del AMHT, en ninguno de los grupos de exposición. La concentración del medicamento utilizado (10 mg/L) puede ser un factor importante ante la ausencia aparente de toxicidad.
- Estudios previos muestran que hormonas del tipo sexual como el estrógeno o la progesterona interactúan molecularmente con las células de los nematodos *C. elegans* por receptores de hormonas nucleares (NHR) o la glicoproteína P (P-gp), lo que indica que, a pesar de ser imperceptibles en los comportamientos, interacciones pueden estar ocurriendo a nivel molecular.
- El sinergismo de la acción de los medicamentos presentes en el cauce hídrico del “Arroio Dourado” no son evaluados en este proyecto, imposibilitando así declarar que el agua de la localidad carece de toxicidad para los organismos biológicos expuestos al uso y consumo de dicha agua.
- Se encuentra necesaria la repetición de los análisis de manera a corroborar los resultados obtenidos en este trabajo, así como la realización de nuevos estudios que permitan estudiar nuevas interacciones medicamentosas mediante el uso del indicador biológico *C. elegans*.

## REFERENCIAS

ABBAS, A. *et al.* Ecotoxicological impacts of surface water and wastewater from conventional and advanced treatment technologies on brood size, larval length, and cytochrome P450 (35A3) expression in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 13868–13880, 1 maio 2018.

ADEEL, M. *et al.* Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. **Environment International**, v. 99, p. 107–119, 1 fev. 2017.

ALCARAZ GARCETE, L. A. **Evaluación del Efecto Protector de la Rutina Frente a los Efectos Tóxicos Inducidos por Atrazina en *Caenorhabditis elegans***. Trabalho de Conclusão de Curso—Foz do Iguaçu, PR: Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), 2022.

ALTUN, Z.; HALL, D. Introduction to *C. elegans* anatomy. **WormAtlas**, 2009.

ALVARENGA, N. *et al.* Biodegradation of chlorpyrifos by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Trichoderma* sp. **J Microb Biochem Technol**, v. 7, p. 133–139, 2015.

AMENABAR, M. J.; BOYD, E. S. A review of the mechanisms of mineral-based metabolism in early Earth analog rock-hosted hydrothermal ecosystems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 29, 28 jan. 2019.

ANDERSON, G. L.; COLE, R. D.; WILLIAMS, P. L. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 23, n. 5, p. 1235–1240, 2004.

ANTEBI, A. *et al.* Chapter 21: Cell and Growth Cone Migrations. Em: ***C. elegans* II. 2nd Edition**. 2. ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

AQUINO, A. R. DE; PALETTA, F. C.; ALMEIDA, J. R. DE. **Risco ambiental**. São Paulo: Blucher, 2017.

ARANTES, L. P. *et al.* Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) attenuates methylmercury-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology Research**, v. 5, n. 6, p. 1629–1638, 1 nov. 2016.

**Aspectos legais e ambientais do descarte de resíduos de medicamentos.** Dissertação de Mestrado—Medianeira, PR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2009.

BARRIOS-ESTRADA, C. *et al.* Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. **Science of The Total Environment**, v. 612, p. 1516–1531, 15 jan. 2018.

BELFROID, A. C. *et al.* Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1, p. 101–108, 12 jan. 1999.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química nova**, v. 26, p. 523–530, 2003.

BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Revisão sobre fármacos no ambiente. **Revista DAE**, v. 66, n. 210, p. 78–95, 2018.

BOUTET, A.; SCHIERWATER, B. **Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology: Established and Emerging.** [s.l.] CRC Press, 2021.

BRANCO, F. O. L. *et al.* Contaminantes Emergentes nas Bacias Hidrográficas Brasileiras e seus potenciais efeitos a espécies ameaçadas de extinção. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, 2021.

BRENNER, I. R.; RAIZEN, D. M.; FANG-YEN, C. Pharyngeal timing and particle transport defects in *Caenorhabditis elegans* feeding mutants. **Journal of Neurophysiology**, v. 128, n. 2, p. 302–309, 1 ago. 2022.

ČADKOVÁ, Z. *et al.* The response of soil nematode *Caenorhabditis elegans* on the sewage sludge-derived micropollutants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, p. 121468, 15 fev. 2020.

CALAND, R. B. DE O. **Atividade antioxidante e neuroprotetora dos sucos de laranja *Citrus sinensis* L. Osbeck (Bahia e Cara Cara) no modelo *Caenorhabditis elegans*.** Tese Doutoral—Natal, RN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 21 jun. 2019.

CARRILLO NORTE, J. A. Metabolismo de fármacos en el organismo. El proceso farmacocinético: ¿ llega el fármaco al sitio de acción? **Rev. Rol enferm**, v. 34, n. 7/8, p. 532–540, 2011.

CASEY, W. *et al.* A New Path Forward: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and National Toxicology Program's Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 2, p. 170–173, 1 mar. 2015.

CASSADA, R. C.; RUSSELL, R. L. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 46, n. 2, p. 326–342, 1 out. 1975.

CERON, L. P. Contaminação de água por descarte de fármacos. **Revista Tratamento de Água & Efluentes**, v. 1, n. 1, p. 14–19, 2011.

CHALFIE, M.; WHITE, J.; WOOD, W. The nematode *Caenorhabditis elegans*. 1988.

CHARAO, M. F. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5093, 2015.

CHEN, H. *et al.* A review of toxicity induced by persistent organic pollutants (POPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Environmental Management**, v. 237, p. 519–525, 1 maio 2019.

CHEN, P.-H.; HSIAO, K.-M.; CHOU, C.-C. Molecular characterization of toxicity mechanism of single-walled carbon nanotubes. **Biomaterials**, v. 34, n. 22, p. 5661–5669, 1 jul. 2013.

CHIANG, Y.-R. *et al.* Microbial degradation of steroid sex hormones: implications for environmental and ecological studies. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 926–949, 1 jul. 2020.

CHOWDHARY, P. *et al.* Bacterial degradation of distillery wastewater pollutants and their metabolites characterization and its toxicity evaluation by using *Caenorhabditis elegans* as terrestrial test models. **Chemosphere**, v. 261, p. 127689, 1 dez. 2020.

CIDADE-BRASIL.COM.BR. **Município de Foz do Iguaçu**. Disponível em: <<https://www.cidade-brasil.com.br/municipio-foz-do-iguacu.html>>. Acesso em: 1 mar. 2022.

CINTRA, G. A. S. *et al.* Expanding the Biological Application of Fluorescent Benzothiadiazole Derivatives: A Phenotypic Screening Strategy for Anthelmintic Drug Discovery Using *Caenorhabditis elegans*. **SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery**, v. 24, n. 7, p. 755–765, 1 ago. 2019.

CLAVIJO LARA, A. M. **El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico de estudios tóxico-moleculares para la evaluación de la calidad de aguas**. Tesis Doctoral—Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires, 15 set. 2017.

COLE, R. D.; ANDERSON, G. L.; WILLIAMS, P. L. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 194, n. 3, p. 248–256, 1 fev. 2004.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387–407, 1 jun. 2015.

DA SILVA ESCHER, M. A. *et al.* A problemática ambiental da contaminação dos recursos hídricos por fármacos. **Brazilian Journal of Environmental Sciences (Online)**, n. 51, p. 141–148, 2019.

DA SILVA, S. S. *et al.* **Avaliação da exposição e risco de contaminantes da água superficial e subterrânea de um lixão desativado: Arroio Dourado-Foz do Iguaçu/PR**. . Em: ENCONTRO DE PESQUISA E EXTENSÃO DA UNIGUAÇU. Faculdade de ensino superior de São Miguel do Iguaçu: 23 out. 2021.

DALLA VALLE, R. C. **Indicador de salubridade ambiental – ISA do bairro Arroio Dourado: Foz do Iguaçu - PR**. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização—Medianeira, PR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 11 abr. 2014.

DE SOUSA, P. V. A. *et al.* Efeitos do descarte de medicamentos no meio ambiente. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e198973868–e198973868, 2020.

DEL ARCO, C. Metabolismo de los fármacos. **Farmacología humana**, v. 5, p. 73–85, 2008.

DEVANEY, E. Thermoregulation in the life cycle of nematodes. **Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites** 6-11 September 2005, Hydra, Greece, v. 36, n. 6, p. 641–649, 31 maio 2006.

DROPKIN, V.; LOWER, W.; ACEDO, J. Growth inhibition of *Caenorhabditis elegans* and *Panagrellus redivivus* by selected mammalian and insect hormones. **Journal of Nematology**, v. 3, n. 4, p. 349, 1971.

ENGELKIRK, P. G.; ENGELKIRK, J. D. **Burton - Microbiologia para as Ciências da Saúde**. [s.l.] Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000.

FARIAS, D. F. *et al.* COVID-19 Therapies in Brazil: Should We Be Concerned with the Impacts on Aquatic Wildlife? **Environmental toxicology and chemistry**, v. 39, n. 12, p. 2348–2350, 2020.

FARTO, C. D. *et al.* CONTAMINANTES EMERGENTES NO BRASIL NA DÉCADA 2010-2019—PARTE I: OCORRÊNCIA EM DIVERSOS AMBIENTES AQUÁTICOS. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v. 18, n. 2021, 2021.

FRIGO, J. P. **Educação ambiental e construção civil: práticas de gestão de resíduos em Foz do Iguaçu-PR**. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização—Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

GABRIELSON, J. *et al.* Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, n. 1, p. 63–73, 1 jun. 2002.

GÁMEZ-DEL-ESTAL, M. M. *et al.* Epigenetic effect of testosterone in the behavior of *C. elegans*. A clue to explain androgen-dependent autistic traits? **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, 2014.

GARDNER, M.; ROSELL, M.; MYERS, E. M. Measuring the Effects of Bacteria on *C. elegans* Behavior Using an Egg Retention Assay. **JoVE**, n. 80, p. e51203, 22 out. 2013.

GEMS, D.; RIDDLE, D. L. Longevity in *Caenorhabditis elegans* reduced by mating but not gamete production. **Nature**, v. 379, n. 6567, p. 723–725, 1 fev. 1996.

GIMENES, E.; HISING, E. **Aterros sanitários, aterros controlados e lixões: entenda o destino do lixo no Paraná.** Disponível em: <<https://g1.globo.com/pr/parana/noticia/aterros-sanitarios-aterros-controlados-e-lixoes-entenda-o-destino-do-lixo-no-parana.ghtml>>. Acesso em: 1 mar. 2022.

GLASSMEYER, S. T. *et al.* Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States. **Science of the Total Environment**, v. 581, p. 909–922, 2017.

GONZÁLEZ, V. *et al.* **C. elegans como organismo modelo en estudios de la toxicidad ambiental en agua y sedimentos.** . Em: CONFERENCE PROCEEDINGS UTMACH. Universidad Técnica de Machala, 19 jul. 2018.

GRAPHPAD SOFTWARE. **GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows.** San Diego, California - USA GraphPad Software, LLC, , 2022. Disponível em: <[www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)>

GREENWALD, I. Chapter 19: Development of the Vulva. Em: **C. elegans II. 2nd Edition.** 2. ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

GRIGNET, R. **Avaliação do potencial biodegradador de fármacos por microrganismos isolados do riacho Arroio Dourado.** Dissertação de Mestrado—Foz do Iguaçu, PR: Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), 2022.

HE, C. *et al.* Enhanced Longevity by Ibuprofen, Conserved in Multiple Species, Occurs in Yeast through Inhibition of Tryptophan Import. **PLOS Genetics**, v. 10, n. 12, p. e1004860, 18 dez. 2014.

HERNANDO, G. **Receptores cys-loop de Caenorhabditis elegans: propiedades farmacológicas y funcionales.** Tesis Doctoral—Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional del Sur, 2013.

HERNDON, L. A.; LINTS, R.; HALL, D. H. **Glossary F.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3908/wormatlas.6.6>>. Acesso em: 1 mar. 2022.

HILLIARD, M. A. *et al.* Worms taste bitter: ASH neurons, QUI-1, GPA-3 and ODR-3 mediate quinine avoidance in *Caenorhabditis elegans*. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 5, p. 1101–1111, 10 mar. 2004.

HOLANDA, F. H. E *et al.* Study of biodegradation of chloramphenicol by endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil nuts). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101200, 1 jul. 2019.

HUANG, Y. *et al.* Emerging contaminants in municipal wastewaters and their relevance for the surface water contamination in the tropical coastal city Haikou, China. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 235, p. 106611, 5 abr. 2020.

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50–59, 1 jan. 2017.

HUNT, P. R.; OLEJNIK, N.; SPRANDO, R. L. Toxicity ranking of heavy metals with screening method using adult *Caenorhabditis elegans* and propidium iodide replicates toxicity ranking in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3280–3290, 1 set. 2012.

IMANIKIA, S. *et al.* The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 356–361, 1 jul. 2016.

INECC. **Evaluación de la peligrosidad y relaciones dosis-respuesta**. Disponível em: <<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/314/evaluacion.html>>. Acesso em: 1 mar. 2022.

IRWIN, L. K.; GRAY, S.; OBERDÖRSTER, E. Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 55, n. 1, p. 49–60, 1 nov. 2001.

IVSHINA, I. B. *et al.* Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9159, 24 jun. 2019.

JIANG, Y. *et al.* Sublethal Toxicity Endpoints of Heavy Metals to the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0148014, 29 jan. 2016.

JIN, M. S. *et al.* Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 490, n. 7421, p. 566–569, 1 out. 2012.

JOSS, A. *et al.* Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. **Water Research**, v. 40, n. 8, p. 1686–1696, 1 maio 2006.

JUNG, S.-K. *et al.* Multi-endpoint, High-Throughput Study of Nanomaterial Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 4, p. 2477–2485, 17 fev. 2015.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387–399, 1 maio 2006.

KOBET, R. A. *et al.* *Caenorhabditis elegans*: a model system for anti-cancer drug discovery and therapeutic target identification. **Biomolecules & therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 371, 2014.

KOSJEK, T.; HEATH, E.; KOMPARE, B. Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1379–1387, 1 fev. 2007.

KUHN, E. C. *et al.* Ecotoxicological assessment of Uruguay River and affluents pre- and post-pesticides' application using *Caenorhabditis elegans* for biomonitoring. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 17, p. 21730–21741, 1 maio 2021.

KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 8, p. 2354–2366, 1 jun. 2009.

LANCHOTE, V. L. *et al.* HPLC screening and GC-MS confirmation of triazine herbicides residues in drinking water from sugar cane area in Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 118, n. 3, p. 329–338, 2000.

LEUNG, M. C. K. *et al.* *Caenorhabditis elegans* Generates Biologically Relevant Levels of Genotoxic Metabolites from Aflatoxin B1 but Not Benzo[a]pyrene In Vivo. **Toxicological Sciences**, v. 118, n. 2, p. 444–453, 1 dez. 2010.

L'HERNAULT, S. W. Spermatogenesis. **WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]**, 2006.

LI, W.-H. *et al.* Assessment of selenium toxicity on the life cycle of *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 7, p. 1245–1253, 1 set. 2014.

LIMA, D. R. S. *et al.* Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, p. 1043–1054, 2017.

LIU, S.-S. *et al.* Microbial transformation of progesterone and dydrogesterone by bacteria from swine wastewater: Degradation kinetics and products identification. **Science of The Total Environment**, v. 701, p. 134930, 20 jan. 2020.

LORENCE, A. V.; TINO BALESTRA, C. E. **Identificação da pluma de gás metano no subsolo do lixão Arroio Dourado - Estudo de caso.** . Em: CONGRESSO TÉCNICO CIENTÍFICO DA ENGENHARIA E DA AGRONOMIA (CONTECC). Foz do Iguaçu, PR: 2016. Disponível em: <<https://www.confea.org.br/sites/default/files/uploads-imce/contecc2016/civil/identifica%C3%A7%C3%A3o%20da%20pluma%20de%20g%C3%A1s%20metano%20no%20subsolo%20do%20lix%C3%A3o%20arroio%20dourado%20%E2%80%93%20estudo%20de%20caso.pdf>>. Acesso em: 1 mar. 2022

MAIA, A. C. B. L. **Regime de responsabilidade pelos danos causados pelos contaminantes emergentes como risco do desenvolvimento.** Dissertação de Mestrado—Brasília, Brasil: Centro de Ensino Unificado de Brasília, 2021.

MÂNICA, A. T.; KUO, Y. C. **Análise da qualidade da água em um trecho do Arroio Dourado no município de Foz do Iguaçu-PR.** Trabalho de Conclusão de Curso—Medianeira, PR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011.

MARCO-URREA, E.; REDDY, C. A. Degradation of Chloro-organic Pollutants by White Rot Fungi. Em: SINGH, S. N. (Ed.). **Microbial Degradation of Xenobiotics.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 31–66.

MARTÍNEZ-ALCALÁ, I.; GUILLÉN-NAVARRO, J. M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, C. Pharmaceutical biological degradation, sorption and mass balance determination in a conventional activated-sludge wastewater treatment plant from Murcia, Spain. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, p. 332–340, 15 maio 2017.

MATSUURA, T.; MIURA, H.; NISHINO, A. Inhibition of gustatory plasticity due to acute nicotine exposure in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Neuroscience Research**, v. 77, n. 3, p. 155–161, 1 nov. 2013.

MATTHIESSEN, P. *et al.* The impact of oestrogenic and androgenic contamination on marine organisms in the United Kingdom—summary of the EDMAR programme. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3, p. 645–649, 1 set. 2002.

MEDFU TAREKEGN, M.; ZEWDU SALILIH, F.; ISHETU, A. I. Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. **Cogent Food & Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1783174, 2020.

MIMOTO, A. *et al.* Identification of an estrogenic hormone receptor in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 364, n. 4, p. 883–888, 28 dez. 2007.

MOITA, R.; CUDO, K. Aspectos gerais da qualidade da água no Brasil. **Reunião técnica sobre qualidade da água para consumo humano e saúde no Brasil**, v. 6, 1991.

MOLINA, M. C. *et al.* From Laboratory Tests to the Ecoremedial System: The Importance of Microorganisms in the Recovery of PPCPs-Disturbed Ecosystems. **Applied Sciences**, v. 10, n. 10, 2020.

MONICA, S. *et al.* Formulation of effective microbial consortia and its application for sewage treatment. **J Microbial Biochem Technol**, v. 3, p. 051–055, 2011.

MONTAGNER, C. C. *et al.* Ten years-snapshot of the occurrence of emerging contaminants in drinking, surface and ground waters and wastewaters from São Paulo State, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 614–632, 2019.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, p. 1094–1110, 2017.

MOUSSA, S. H. *et al.* Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. **Journal of Mycology**, v. 2013, 2013.

MOYA, A. *et al.* Reproductive toxicity by exposure to low concentrations of pesticides in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology**, v. 475, p. 153229, 15 jun. 2022.

OJOGHORO, J. O.; SCRIMSHAW, M. D.; SUMPTER, J. P. Steroid hormones in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**, v. 792, p. 148306, 20 out. 2021.

OLIVEIRA, R.; RAMIREZ, K. G.; DI LAURO, M. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICO DO SOLO DA ÁREA DE CONTAMINAÇÃO DO ARROIO DOURADO, EM FOZ DO IGUAÇU.

**International Journal of Environmental Resilience Research and Science-IJERRS**, v. 3, n. 2, 27 set. 2021.

PAGE, A. P.; JOHNSTONE, I. J. The cuticle. **WormBook**, p. 15, 2007.

PARRA GUARDADO, A. L. *et al.* Effect of redox mediators in pharmaceuticals degradation by laccase: A comparative study. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 123–131, 1 mar. 2019.

PETERSON, R. T. *et al.* Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. **NeuroToxicology**, v. 29, n. 3, p. 546–555, 1 maio 2008.

PHOON, B. L. *et al.* Conventional and emerging technologies for removal of antibiotics from wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 400, p. 122961, 5 dez. 2020.

PMFI. **Plano Municipal de Saneamento Básico – PMSB Abastecimento de Água e Esgotamento Sanitário Relatório Final**. Foz do Iguaçu, PR: Prefeitura Municipal de Foz do Iguaçu. Secretária Municipal de Meio Ambiente, 2019. Disponível em: <<https://www5.pmf.pr.gov.br/publicacao-653>>. Acesso em: 1 mar. 2022.

PMFI. **Plano Municipal de Conservação e Recuperação da Mata Atlântica - PMMA**. Foz do Iguaçu, PR: Prefeitura Municipal de Foz do Iguaçu. Secretária Municipal de Meio Ambiente, 2020. Disponível em: <<https://portal.unila.edu.br/noticias/plano-municipal-de-mata-atlantica-pode-fortalecer-o-turismo-em-foz-do-iguacu/PMMAFoz.pdf>>. Acesso em: 1 mar. 2022.

POLAK, N. *et al.* Metalloproteins and phytochelatin synthase may confer protection against zinc oxide nanoparticle induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 160, p. 75–85, 1 mar. 2014.

PORTA-DE-LA-RIVA, M. *et al.* Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. **JoVE**, n. 64, p. e4019, 10 jun. 2012.

QUADRA, G. R. *et al.* **Medicamentos e Meio ambiente: soluções individuais, problemas coletivos**. Disponível em: <<https://oeco.org.br/analises/medicamentos-e-meio-ambiente-solucoes-individuais-problemas-coletivos/>>. Acesso em: 5 dez. 2022.

RALEY-SUSMAN, K. M. Like a Canary in the Coal Mine: Behavioral Change as an Early Warning Sign of Neurotoxicological Damage. Em: **Pesticides: Toxic Aspects**. [s.l.] InTechOpen, 2014. p. 135–162.

RASHEED, T. *et al.* Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. **Environment international**, v. 122, p. 52–66, 2019.

RIBAS, P. P. *et al.* Estudos sobre remoção de micropoluentes emergentes em efluentes no Brasil: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 9, n. 1, 2021.

RODGERS-GRAY, T. P. *et al.* Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. **Environmental science & technology**, v. 35, n. 3, p. 462–470, 2001.

ROUT, P. R. *et al.* Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. **Science of The Total Environment**, v. 753, p. 141990, 20 jan. 2021.

RUI, Q. *et al.* Biosafety assessment of titanium dioxide nanoparticles in acutely exposed nematode *Caenorhabditis elegans* with mutations of genes required for oxidative stress or stress response. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2289–2296, 1 nov. 2013.

RUSSEL, S.; FRAND, A. R.; RUVKUN, G. Regulation of the *C. elegans* molt by pqn-47. **Developmental Biology**, v. 360, n. 2, p. 297–309, 15 dez. 2011.

RUSZKIEWICZ, J. A. *et al.* *C. elegans* as a model in developmental neurotoxicology. **Alternative Approaches to Developmental Neurotoxicity Evaluation**, v. 354, p. 126–135, 1 set. 2018.

SÁNCHEZ-BAIN, A. *et al.* Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. **Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo**, p. 190, 2004. .

SHARMA, V.; PANT, D. Structural basis for expanding the application of bioligand in metal bioremediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 252, p. 188–197, 1 mar. 2018.

SIVARANJANEE, R.; KUMAR, P. S. A review on remedial measures for effective separation of emerging contaminants from wastewater. **Environmental Technology & Innovation**, v. 23, p. 101741, 1 ago. 2021.

SMITH, R. *et al.* Premature and accelerated aging: HIV or HAART? **Frontiers in Genetics**, v. 3, 2013.

SOARES, L. M. **Avaliação da Atividade Citotóxica e Genotóxica em Águas Superficiais e Subterrâneas na Região do Lixão Desativado em Foz do Iguaçu-PR**. Dissertação de Mestrado—Foz do Iguaçu, PR: Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), 2022.

SOUZA, R. C. DE. **Determinação de fármacos em mananciais do estado de São Paulo e estudo da sua ecotoxicidade sobre a cianobactéria *Microcystis aeruginosa***. Tesis Doctoral—São Paulo: Universidade de São Paulo, 2017.

SPEIDA, J. *et al.* Metaproteomics-guided selection of targeted enzymes for bioprospecting of mixed microbial communities. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 128, 16 maio 2017.

SULSTON, J. E. Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 275, n. 938, p. 287–297, 1976.

SULSTON, J. E.; HORVITZ, H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Developmental biology**, v. 56, n. 1, p. 110–156, 1977.

SURJO PRABHA, P.; MANOJ, S. Screening of agrochemicals on *Caenorhabditis elegans*. **Advanced Biotech**, v. 8, p. 17–21, 2009.

TEJEDA-BENITEZ, L.; OLIVERO-VERBEL, J. *Caenorhabditis elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology. Em: DE VOOGT, W. P. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 237p. 1–35.

TERNES, T. A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — II. Aerobic batch experiments with activated sludge. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1, p. 91–99, 12 jan. 1999.

THI MINH LE, T. *et al.* Isolation of endophytic fungi and screening of Huperzine A–producing fungus from *Huperzia serrata* in Vietnam. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 16152, 6 nov. 2019.

TOMINAGA, N. *et al.* *Caenorhabditis elegans* Responses to Specific Steroid Hormones. **Journal of Health Science**, v. 49, n. 1, p. 28–33, 2003.

TORGOVNICK, A. *et al.* Healthy aging: what can we learn from *Caenorhabditis elegans*? **Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie**, v. 46, n. 7, p. 623–628, 1 out. 2013.

VAHDATI NIA, B. *et al.* Meta Analysis of Human AlzGene Database: Benefits and Limitations of Using *C. elegans* for the Study of Alzheimer’s Disease and Co-morbid Conditions. **Frontiers in Genetics**, v. 8, 2017.

VARGAS ARAUJO, P. **Diseño de los sistemas de saneamiento básico en la comunidad de Nueva luz, centro poblado de Lobo Tahuantinsuyo, distrito de Kimbiri, provincia de la Convención, departamento de Cusco para la mejora de la condición sanitaria de la población.** Tesis de Licenciatura—Perú: Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, 23 mar. 2019.

VARJANI, S.; UPASANI, V. N. Bioaugmentation of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 – A novel oily waste degrader for treatment of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124240, 1 jan. 2021.

WILLIAMS, P. L.; DUSENBERY, D. B. A Promising Indicator of Neurobehavioral Toxicity Using the Nematode *Caenorhabditis elegans* and Computer Tracking. **Toxicology and Industrial Health**, v. 6, n. 3–4, p. 425–440, 1 maio 1990.

WU, Q. *et al.* Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1123–1131, 1 jan. 2013.

WU, Z.-Q. *et al.* Effects of ethanol intake on anti-oxidant responses and the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **CyTA - Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 288–296, 1 jan. 2019.

ZECHINELLI LEZAMA, G. **Solución analítica para la determinación de la interfase agua salada-agua dulce en acuíferos costeros.** Tesis de Licenciatura—Puebla, México: ENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA, 2018.

ZHANG, H.; GAO, S.; CHEN, W. Automated recognition and analysis of head thrashes behavior in *C. elegans*. **BMC Bioinformatics**, v. 23, n. 1, p. 87, 7 mar. 2022.

ZHANG, W. *et al.* Biosafety assessment of Gd@C82(OH)22 nanoparticles on *Caenorhabditis elegans*. **Nanoscale**, v. 3, n. 6, p. 2636–2641, 2011.

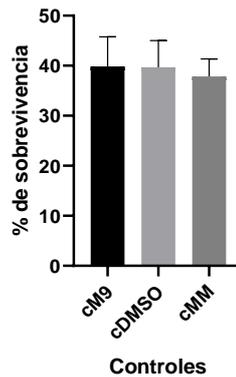
ZHAO, Y. *et al.* Transgenerational effects of traffic-related fine particulate matter (PM2.5) on nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 274, p. 106–114, 15 jun. 2014.

ŻUR, J. *et al.* Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 22, p. 21498–21524, 1 ago. 2018.

## MATERIAL SUPLEMENTAR 1

### GRÁFICOS CORRESPONDIENTES A LOS CONTROLES DERIVADOS DE EXPOSICIÓN EN L1

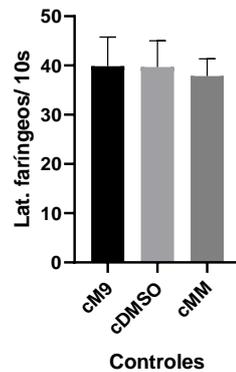
**Gráfico S 1 - PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA EN *C. ELEGANS* FRENTE A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**



Leyenda: Análisis de supervivencia en los gusanos tratados en L1 con los controles M9, DMSO y MM, 24 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

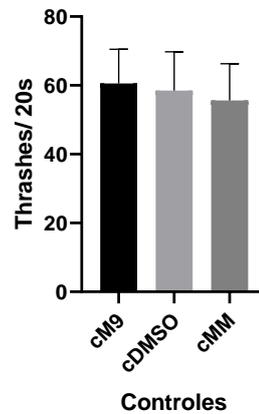
**Gráfico S 2 - LATIDOS FARÍNGEOS CONTABILIZADOS EN 10 SEGUNDOS EN LOS *C. ELEGANS* FRENTE A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**



Leyenda: Efecto en los latidos faríngeos de los gusanos tratados en L1, con los controles M9, DMSO y MM, analizado aproximadamente 40 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

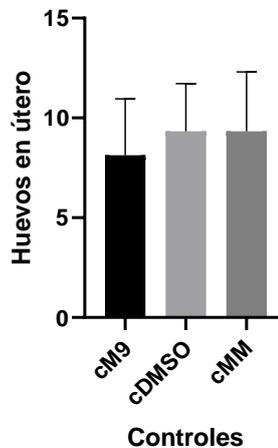
**Gráfico S 3 - NÚMERO DE THRASHES EN 20 S EN *C. ELEGANS* FRENTE A LA EXPOSICIÓN A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**



Leyenda: Efecto en la locomoción de los gusanos tratados en L1 tras la exposición de los controles M9, DMSO y MM, aproximadamente 48 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

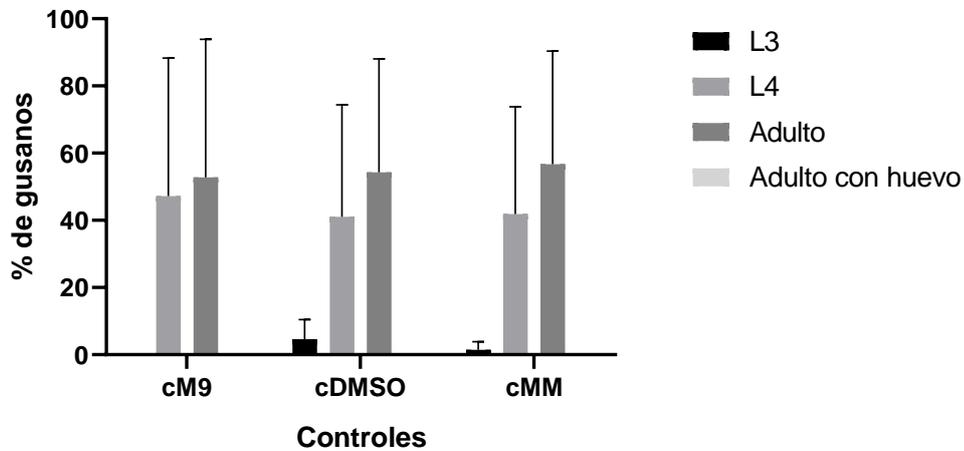
**Gráfico S 4 - NÚMERO DE HUEVOS EN EL ÚTERO DE LOS *C. ELEGANS* FRENTE A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**



Leyenda: Efecto en la formación de huevos de los gusanos tratados en L1, tras la exposición de los controles M9, DMSO y MM, aproximadamente 72 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

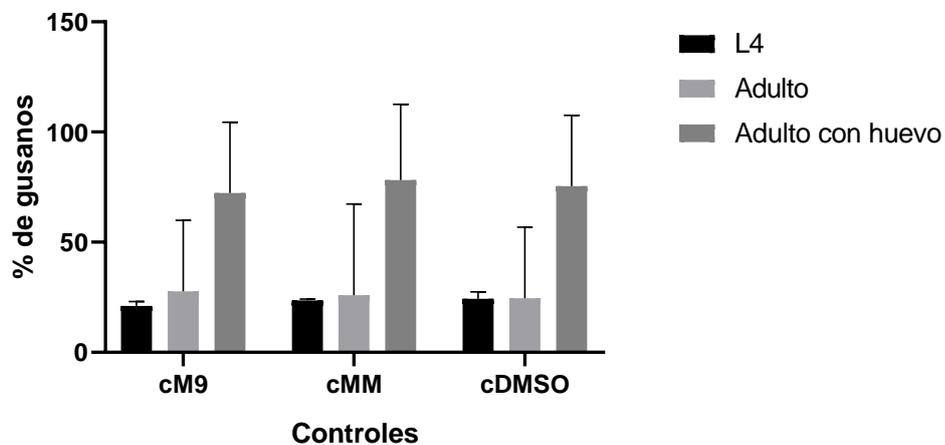
**Gráfico S 5 - PORCENTAJE DE DESARROLLO DE LOS *C. ELEGANS* 48 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**



Leyenda: Efecto en el desarrollo de los gusanos tratados en L1, con los controles M9, DMSO y MM, 48 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

**Gráfico S 6 - PORCENTAJE DE DESARROLLO DE LOS *C. ELEGANS* 72 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**

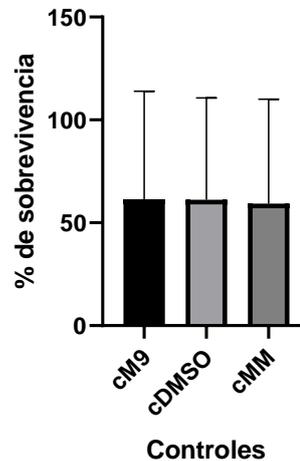


Leyenda: Efecto en el desarrollo de los gusanos tratados en L1, con los controles M9, DMSO y MM, 72 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

GRÁFICOS CORRESPONDIENTES A LOS CONTROLES DERIVADOS DE EXPOSICIÓN EN L1 SIN LAVADO

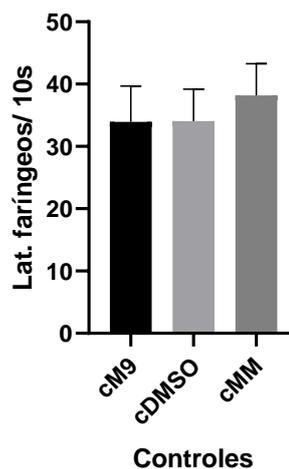
**Gráfico S 7 - PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA EN *C. ELEGANS* FRENTE A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**



Leyenda: Análisis de supervivencia en los gusanos tratados en L1, sin lavado, con los controles M9, DMSO y MM, 24 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

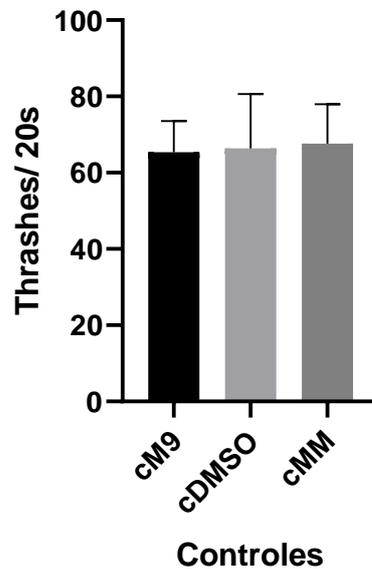
**Gráfico S 8 - LATIDOS FARÍNGEOS CONTABILIZADOS EN 10 SEGUNDOS EN LOS *C. ELEGANS* FRENTE A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**



Leyenda: Efecto en los latidos faríngeos de los gusanos tratados en L1, sin lavado, con los controles M9, DMSO y MM, analizado aproximadamente 40 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

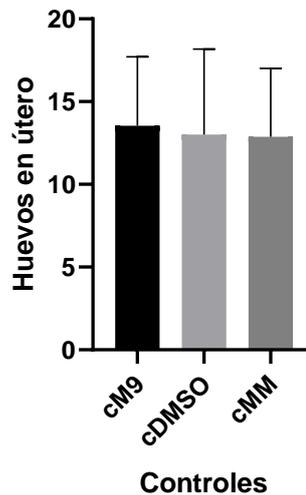
**Gráfico S 9** - NÚMERO DE *THRASHES* EN 20 S EN *C. ELEGANS* FRENTE A LA EXPOSICIÓN A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM



Leyenda: Efecto en la locomoción de los gusanos tratados en L1, sin lavado, tras la exposición de los controles M9, DMSO y MM, aproximadamente 48 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

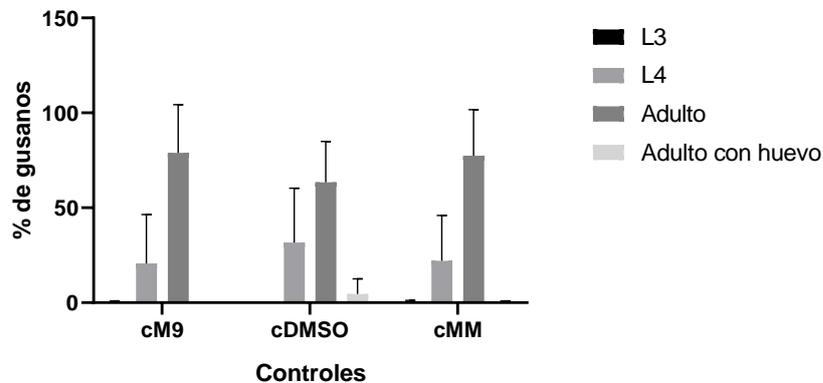
**Gráfico S 10** - NÚMERO DE HUEVOS EN EL ÚTERO DE LOS *C. ELEGANS* FRENTE A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM



Leyenda: Efecto en la formación de huevos de los gusanos tratados en L1, sin lavado, tras la exposición de los controles M9, DMSO y MM, aproximadamente 72 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

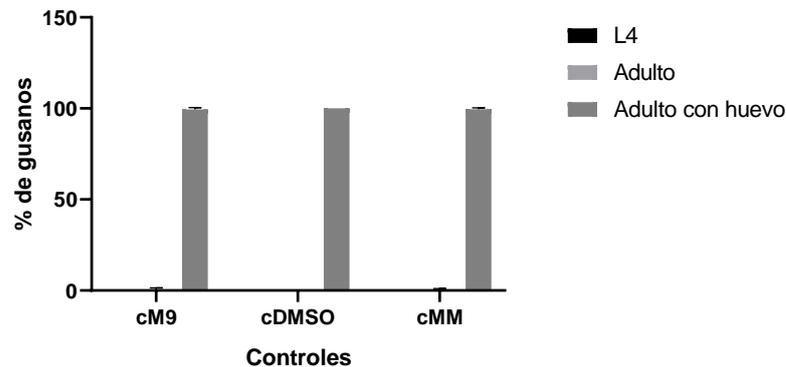
**Gráfico S 11 - PORCENTAJE DE DESARROLLO DE LOS *C. ELEGANS* 48 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**



Leyenda: Efecto en el desarrollo de los gusanos tratados en L1, sin lavado, con los controles M9, DMSO y MM, 48 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

**Gráfico S 12 - PORCENTAJE DE DESARROLLO DE LOS *C. ELEGANS* 72 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**

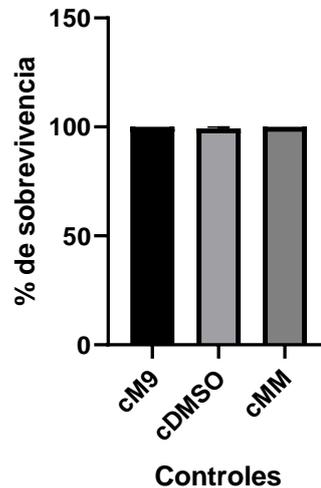


Leyenda: Efecto en el desarrollo de los gusanos tratados en L1, sin lavado, con los controles M9, DMSO y MM, 72 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

GRÁFICOS CORRESPONDIENTES A LOS CONTROLES DERIVADOS DE EXPOSICIÓN EN L4

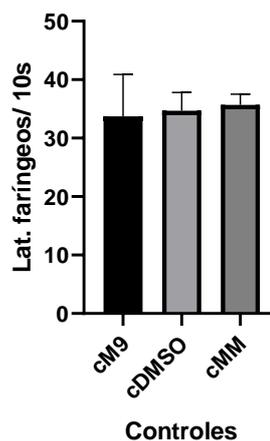
**Gráfico S 13** - PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA EN *C. ELEGANS* FRENTE A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM



Leyenda: Análisis de supervivencia en los gusanos tratados en L4, con los controles M9, DMSO y MM, 24 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

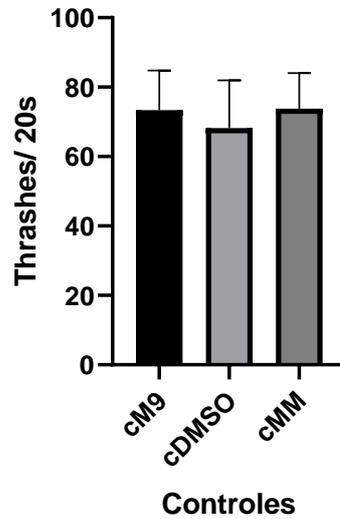
**Gráfico S 14** - LATIDOS FARÍNGEOS CONTABILIZADOS EN 10 SEGUNDOS EN LOS *C. ELEGANS* FRENTE A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM



Leyenda: Efecto en los latidos faríngeos de los gusanos tratados en L4, con los controles M9, DMSO y MM, analizado aproximadamente 10 min después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

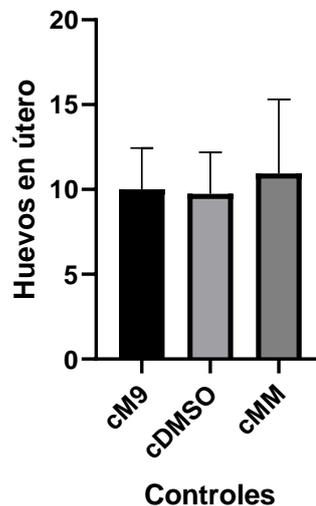
**Gráfico S 15** - NÚMERO DE *THRASHES* EN 20 S EN *C. ELEGANS* FRENTE A LA EXPOSICIÓN A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM



Leyenda: Efecto en la locomoción de los gusanos tratados en L4, tras la exposición de los controles M9, DMSO y MM, aproximadamente 10 min después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

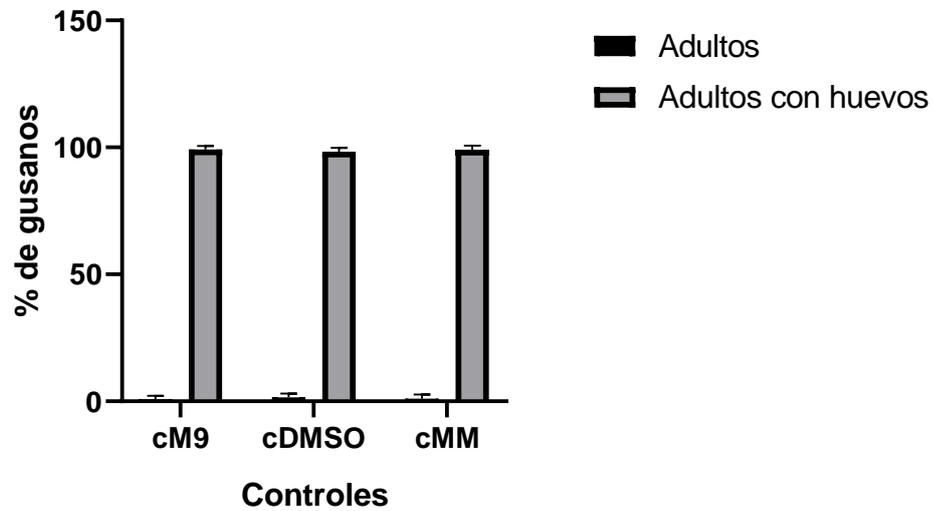
**Gráfico S 16** - NÚMERO DE HUEVOS EN EL ÚTERO DE LOS *C. ELEGANS* FRENTE A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM



Leyenda: Efecto en la formación de huevos de los gusanos tratados en L4, tras la exposición de los controles M9, DMSO y MM, 24 h después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de 5 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Fuente: la autora.

**Gráfico S 17 - PORCENTAJE DE DESARROLLO DE LOS *C. ELEGANS* 24 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A LOS CONTROLES M9, DMSO Y MM**



Leyenda: Efecto en el desarrollo de los gusanos tratados en L4, con los controles M9, DMSO y MM, 48 hs después de la exposición. Los valores corresponden al análisis de aproximadamente 100 gusanos por grupo, por triplicado. Los valores representan medias  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey. La significación estadística se fijó en  $p < 0,05$

Fuente: la autora.

## MATERIAL SUPLEMENTAR 2

Tabla S 1 - Desarrollo de *C. elegans* en relación a la variación de temperatura

DEVELOPMENT AT DIFFERENT TEMPERATURES			
	"16°C" (16.0 ± 0.3°C)	"20°C" (19.5 ± 0.5°C)	"25°C" (25.0 ± 0.2°C)
Egg laid	0 hr	0 hr	0 hr
Egg hatches	16-18 hr	10-12 hr	8-9 hr
First-molt lethargus	36.5 hr	26 hr	18.0 hr
Second-molt lethargus	48 hr	34.5 hr	25.5 hr
Third-molt lethargus	60.0 hr	43.5 hr	31 hr
Fourth-molt lethargus	75 hr	56 hr	39 hr
Egg-laying begins	-90 hr	-65 hr	-47 hr
Egg-laying maximal	-140 hr	-96 hr	-62 hr
Egg-laying ends	-180 hr	-128 hr	-88 hr
Length at first molt	360 µm	370 µm	380 µm
Length at second molt	490 µm	480 µm	510 µm
Length at third molt	650 µm	640 µm	620 µm
Length at fourth molt	900 µm	850 µm	940 µm
Length at egg- laying onset	1150 µm	1060 µm	1110 µm
Maximal egg- laying rate	5.4/hr	9.1/hr	8.1/hr
Total eggs laid	275	280	170

Leyenda: Desarrollo de los gusanos a temperaturas de 16°C, 20°C y 25°C.  
Fuente: (ALTUN; HALL, 2009).