



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ALTERACIONES COMPORTAMENTALES PRODUCIDAS POR LA EXPOSICIÓN
AL FÁRMACO ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA EN DOS ESPECIES DE PECES
DE LA FAMILIA POECILIIDAE (TELEOSTEI, CYPRINODONTIFORMES)**

Tesista: Martina Kolesnik

Director: Dr. Fernando Javier Meijide

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecotoxicología Acuática. Departamento de
Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires.

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Junio de 2024

Índice

Resumen	1
Abstract	4
Agradecimientos	7
Introducción	8
La contaminación química como amenaza para la biodiversidad	8
Los fármacos como contaminantes emergentes	9
Fluoxetina	11
El comportamiento como biomarcador	16
Modelos experimentales	18
Objetivos e hipótesis	23
Materiales y métodos	24
Animales	24
Bioensayos de laboratorio	24
Análisis estadístico	31
Resultados	33
Interacciones agresivas	33
Actividad natatoria	40
Niveles endógenos de cortisol	49
Verificación analítica de la concentración de FLX	50
Discusión	51
Condiciones experimentales de los ensayos	51
Efectos de la FLX sobre el comportamiento agresivo y la actividad natatoria	53
Efecto de la FLX sobre los niveles de cortisol	62
Limitaciones del estudio	63
Conclusiones	67
Referencias bibliográficas	68

Resumen

Junto con la degradación del hábitat, la explotación directa de los organismos, el cambio climático y las especies exóticas invasoras, la contaminación química es actualmente señalada como una de las principales causas de la pérdida de biodiversidad a escala global. Entre la gran variedad de contaminantes antropogénicos que ingresan al ambiente acuático, se destacan en el presente los fármacos de uso humano y veterinario. La presencia generalizada de estos contaminantes emergentes en los cuerpos de agua ha generado una creciente preocupación sobre sus potenciales efectos adversos sobre la biota acuática. La fluoxetina (FLX) es uno de los fármacos antidepresivos más ampliamente prescritos a nivel mundial, siendo frecuentemente detectada en cuerpos de agua receptores de efluentes domésticos, hospitalarios y de la industria farmacéutica. Dado que la FLX está diseñada para modular el comportamiento humano y que sus vías de acción están conservadas en los vertebrados, se plantea como interrogante si la presencia de este fármaco en el ambiente acuático puede afectar los patrones comportamentales de especies no blanco como los peces. En este sentido, el comportamiento resulta un indicador ecológicamente relevante de exposición a compuestos neuroactivos ya que puede afectar directamente la aptitud y la supervivencia de los organismos. A su vez, los biomarcadores comportamentales están adquiriendo un creciente interés como sistema de alerta temprana en evaluaciones ecotoxicológicas. En este estudio, se evaluó el efecto de la exposición a FLX sobre el comportamiento agresivo y la actividad natatoria de dos especies de peces dulceacuícolas: una especie nativa, la madrecita *Cnesterodon decemmaculatus*, y una especie exótica, el pez mosquito *Gambusia holbrooki* (Teleostei, Poeciliidae). Asimismo, se cuantificaron los niveles endógenos de cortisol en los peces expuestos a este fármaco. Para cada especie, se realizaron dos ensayos en los que se expusieron hembras adultas a concentraciones nominales de 0 (control); 0,5; 5 y 25 µg/L de FLX durante 14 días, bajo un diseño semiestático con renovación diaria de la solución de ensayo. Los tratamientos se realizaron en acuarios de 4L, con 5 individuos por acuario. Luego del período de exposición, se registraron mediante videograbaciones las interacciones agresivas entre los individuos de cada acuario durante 10 min, antes y al momento de ser alimentados con nauplii de *Artemia sp.* A partir de los registros de video, se cuantificó para cada tratamiento la latencia hasta la manifestación de la primera agresión, así como el número y la duración total de las interacciones agresivas. A continuación, cada pez fue transferido a un acuario individual y al cabo de 90 min, se registró su actividad natatoria durante 10 min. Los videos fueron analizados mediante el software Ethovision XT 12.0 a fin de cuantificar los siguientes parámetros de locomoción: distancia recorrida, velocidad media, tiempo en movimiento, tiempo estático y tiempo en cada tercio de la columna de agua. Finalmente, los peces

fueron sometidos a eutanasia y sus cuerpos fueron almacenados a -80°C para posteriormente extraer los esteroides y cuantificar los niveles de cortisol mediante la técnica de ELISA. En un tercer ensayo efectuado en cada especie, se realizaron los registros de interacciones agresivas luego del período de exposición a FLX y a continuación se procedió directamente a la eutanasia y la toma de muestras para determinación de los niveles de cortisol sobre el material fresco sin congelar. Los resultados de este estudio mostraron diferencias basales entre ambas especies en cuanto a la actividad natatoria y la conducta agresiva así como efectos disímiles de la exposición a FLX sobre estos comportamientos. En *C. decemmaculatus*, se registraron agresiones entre coespecíficos en todos los tratamientos, al momento de ser alimentados, a excepción de uno de los ensayos en el que se observaron pocas interacciones agresivas en ausencia de alimento, en los peces expuestos a la mayor concentración de FLX. En esta especie, se evidenció una tendencia al incremento de la agresividad con la concentración de FLX, resultando significativa la diferencia entre el tratamiento FLX 25 y el grupo control para la mayor parte de los parámetros cuantificados. El análisis de componentes principales mostró una separación de los tratamientos FLX 25 y FLX 5 con respecto al control y FLX 0,5. Sin embargo, el análisis multivariado sobre el conjunto de interacciones agresivas mostró un efecto significativo únicamente para el tratamiento con la mayor concentración de FLX, probablemente debido a que el número de réplicas no fue suficiente como para evidenciar efectos en la concentración intermedia. Por su parte, se registró una correlación significativa entre la mayoría de los parámetros de agresión y la concentración de FLX. En *G. holbrooki*, las conductas agresivas fueron menos evidentes, siendo observadas únicamente en el tratamiento con la mayor concentración de FLX, luego de la alimentación. Estos resultados sugieren que, en ambas especies, la exposición a FLX promueve la agresividad intraespecífica en presencia de alimento. Sin embargo, en *C. decemmaculatus* estos efectos son más notorios y se evidencian a menores concentraciones de FLX que en *G. holbrooki*. En relación a la locomoción, la exposición a la mayor concentración de FLX produjo una atenuación significativa de la actividad natatoria (disminución de la velocidad media, la distancia recorrida y el tiempo en movimiento) y una alteración en la distribución en la columna de agua (aumento del tiempo cerca de la superficie) en ambas especies. Si bien los efectos resultaron significativos únicamente en el tratamiento FLX 25, en *C. decemmaculatus* se observó una tendencia más gradual de alteración de la natación con el aumento de la concentración de FLX que en *G. holbrooki*. Esta diferencia en la respuesta locomotora de ambas especies se vio reflejada en el análisis de componentes principales, el cual mostró una separación más clara del tratamiento FLX 5 con respecto a los restantes tratamientos en *C. decemmaculatus* que en *G. holbrooki*. A su vez, en *G. holbrooki*, el análisis multivariado sobre el conjunto de los parámetros de locomoción mostró un efecto

significativo únicamente para el tratamiento con la mayor concentración de FLX, mientras que en *C. decemmaculatus* se registró un efecto significativo tanto del tratamiento FLX 25 como del tratamiento FLX 5. Para ambas especies, se registró una correlación significativa entre los parámetros de locomoción cuantificados y la concentración de FLX, indicando un efecto concentración-dependiente del fármaco sobre la actividad natatoria. Por su parte, los niveles de cortisol sólo pudieron cuantificarse en las muestras del tercer ensayo, por lo que los resultados deben considerarse como preliminares. En *G. holbrooki*, no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que en *C. decemmaculatus* se observó una tendencia al incremento de los niveles de cortisol en los peces expuestos a FLX. En conjunto, los resultados de este trabajo de tesis indican que, en la especie exótica *G. holbrooki*, las alteraciones comportamentales evaluadas resultaron significativas solo en el tratamiento con la mayor concentración de FLX ensayada (25 µg/L), la cual es dos órdenes de magnitud superior a las de relevancia ambiental. A su vez, dicha concentración provocaría una concentración plasmática del FLX comprendida dentro del rango de dosis terapéuticas para humanos. Sin embargo, en la especie nativa *C. decemmaculatus*, el análisis integral de los resultados indica que tanto el tratamiento FLX 25 como FLX 5 causó una alteración significativa de la actividad natatoria. Por su parte, la agresividad intraespecífica se vio incrementada en los individuos expuestos a la mayor concentración de FLX y un análisis con un mayor número de registros posiblemente permitiría confirmar que la concentración intermedia también tiene un efecto significativo. Aún cuando 5 µg/L sigue siendo una concentración superior a las reportadas en el ambiente acuático, estos hallazgos reflejan una mayor susceptibilidad de la especie nativa con respecto a la especie exótica ante la exposición a FLX. Frente a un escenario de aumento en la producción y consumo de fármacos por parte de una población mundial en constante crecimiento, esto podría tener incidencia a nivel ecológico al implicar una ventaja adaptativa para la especie exótica en detrimento de la especie nativa, favoreciendo su capacidad invasora en un contexto de creciente contaminación del ambiente acuático por fármacos neuroactivos y otros contaminantes antropogénicos. En este sentido, sería necesario extender estos estudios, evaluando posibles alteraciones del comportamiento de especies nativas y exóticas que ocupen un mismo nicho ecológico ante exposiciones de mayor duración a concentraciones de relevancia ambiental de FLX y otros fármacos. Asimismo, sería interesante analizar las interacciones entre especies nativas y exóticas en presencia y ausencia de este tipo de contaminantes, a fin de evaluar potenciales efectos sobre la capacidad competitiva de unas sobre otras.

Abstract

Behavioral alterations caused by exposure to the antidepressant fluoxetine in two fish species of the family Poeciliidae (Teleostei, Cyprinodontiformes).

Along with habitat degradation, direct exploitation of organisms, climate change and invasive alien species, chemical pollution is currently identified as one of the main causes of biodiversity loss on a global scale. Among the wide variety of anthropogenic pollutants entering the aquatic environment, human and veterinary drugs stand out at the present. The widespread presence of these emerging pollutants in water bodies has generated growing concern about their potential adverse effects on aquatic biota. Fluoxetine (FLX) is one of the most widely prescribed antidepressant drugs worldwide and is frequently detected in water bodies receiving domestic, hospital and pharmaceutical effluents. Since FLX is designed to modulate human behavior and that its action pathways are conserved in vertebrates, the question arises as to whether the presence of this drug in the aquatic environment could affect the behavioral patterns of non-target species such as fishes. In this regard, behavior is an ecologically relevant indicator of exposure to neuroactive compounds as it can directly affect the fitness and survival of organisms. In turn, behavioral biomarkers are gaining increasing interest as an early warning system in ecotoxicological assessments. In this study, we assessed the effect of FLX exposure on the aggressive behavior and swimming activity of two freshwater fish species: a native species, the ten spotted live-bearer *Cnesterodon decemmaculatus*, and an exotic species, the mosquitofish *Gambusia holbrooki* (Teleostei, Poeciliidae). In addition, endogenous cortisol levels were quantified in FLX-exposed fishes. For each species, two assays were conducted in which adult females were exposed to nominal concentrations of 0 (control); 0.5; 5 and 25 µg/L FLX for 14 days, under a semi-static design with daily renewal of the test solutions. Treatments were carried out in 4L aquariums, with 5 individuals per aquarium. Following exposure, aggressive interactions between individuals in each aquarium were recorded by video for 10 min, before and at the moment of being fed with *Artemia* sp. nauplii. From the video records, the latency to emergence of the first aggressive display as well as the number and total duration of aggressive interactions were quantified for each treatment. Each fish was then transferred to an individual aquarium and after 90 min, its swimming activity was recorded for 10 min. The videos were analyzed using Ethovision XT 12.0 software in order to quantify the following locomotion parameters: distance traveled, average speed, time in motion, time static and time in each third of the water column. Finally, fish were euthanized and their bodies were stored at -80°C to subsequently extract steroids and quantify cortisol levels using the ELISA technique. In a third assay carried out in each species, aggressive interactions were

recorded after FLX exposure, followed by direct euthanasia and sampling for determination of cortisol levels on fresh, unfrozen samples. The results of this study showed baseline differences between the two species for swimming activity and aggressive displays, as well as dissimilar effects of FLX exposure on these behaviors. In *C. decemmaculatus*, aggression between conspecifics was recorded in all treatments at the moment of feeding, with the exception of one of the assays in which few aggressive interactions were observed in absence of food in fish exposed to the highest FLX concentration. In this species, there was a tendency for aggressiveness to increase with increasing FLX concentration, and the difference between the FLX 25 treatment and the control group was significant for most of the parameters quantified. The principal component analysis showed a separation of the FLX 25 and FLX 5 treatments with respect to control and FLX 0.5. However, the multivariate analysis on the whole set of aggressive interactions showed a significant effect only for the treatment with the highest FLX concentration, probably because the number of replicates was not sufficient to show effects at the intermediate concentration. On the other hand, there was a significant correlation between most of the aggression parameters and FLX concentration. In *G. holbrooki*, aggressive displays were less evident and were observed only in the treatment with the highest FLX concentration after feeding. These results suggest that, in both species, FLX exposure promotes intraspecific aggression in the presence of food. However, in *C. decemmaculatus* these effects are more evident and are evidenced at lower FLX concentrations than in *G. holbrooki*. Regarding locomotion, exposure to the highest FLX concentration produced a significant attenuation of swimming activity (decrease in mean velocity, distance traveled and time in motion) and an alteration in distribution in the water column (increase in time near the surface) in both species. Although the effects were significant only in the FLX 25 treatment, a trend towards progressive swimming impairment with increasing FLX concentration was observed in *C. decemmaculatus*, whereas in *G. holbrooki* no effects were evident at intermediate concentrations. This difference in the locomotor response of both species was reflected in the principal component analysis, which showed a clearer separation of the FLX 5 treatment from the other treatments in *C. decemmaculatus* than in *G. holbrooki*. At the same time, in *G. holbrooki*, the multivariate analysis on the whole set of locomotion parameters showed a significant effect only for the treatment with the highest FLX concentration, while in *C. decemmaculatus* there was a significant effect of both FLX 25 and FLX 5 treatments. For both species, there was a significant correlation between the locomotion parameters and the FLX concentration, indicating a concentration-dependent effect of the drug on swimming activity. Cortisol levels could only be quantified in the samples from the third assay, so these results should be considered preliminary. In *G. holbrooki*, no significant differences between treatments were recorded, whereas in *C. decemmaculatus* a trend towards increased cortisol levels was

observed in fish exposed to FLX. Overall, the results of this thesis work indicate that, in the exotic species *G. holbrooki*, behavioral alterations were significant only in the treatment with the highest concentration of FLX (25 µg/L), which is two orders of magnitude higher than those of environmental relevance. In addition, this concentration would elicit a plasma FLX concentration comprised within the range of human therapeutic doses. However, in the native species *C. decemmaculatus*, the integrated analysis of the results indicates that both FLX 25 and FLX 5 treatments produced a significant alteration of swimming activity. In addition, intraspecific aggressiveness was increased in individuals exposed to the highest FLX concentration and an analysis with a larger number of records would possibly confirm that the intermediate concentration also has a significant effect. Even though 5 µg/L is still a concentration higher than those reported in the aquatic environment, these findings reflect a greater susceptibility of the native species than the exotic species upon FLX exposure. Faced with a scenario of increased production and consumption of pharmaceuticals by a constantly growing world population, this could have an impact at the ecological level by implying an adaptive advantage for the exotic species in detriment of the native species, favoring its invasive capacity in a context of increasing contamination of the aquatic environment by neuroactive compounds and other anthropogenic pollutants. In this sense, it would be necessary to extend these studies, evaluating possible alterations in the behavior of native and exotic species that occupy a same ecological niche in the face of longer-term exposure to environmentally relevant concentrations of FLX and other drugs. Likewise, it would be interesting to analyze the interactions between native and exotic species in the presence and absence of this type of contaminants, in order to evaluate potential effects on the competitive capacity of ones over the others.

Agradecimientos

Es primordial agradecer en primera instancia a la Educación Pública, gratuita y de calidad que me alberga desde la escuela secundaria y me seguirá acompañando, espero, durante el resto de mi carrera. A mi querida Facultad que supo ser hogar y hoy prestigioso lugar de trabajo.

Agradezco infinitamente a todo el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática e Histofisiología de Animales Acuáticos por haber sido compañía, contención y fuente inagotable de conocimientos. Especialmente agradezco a Fer, que no me soltó la mano cuando la pandemia nos alcanzó recién comenzados los ensayos, que tiene todos los días una paciencia infinita y sin quien este trabajo no hubiera sido posible de ninguna manera. A Fabi, tutora y consultora incondicional, por haberme enamorado de novo con los peces. A Isma, siempre dispuesto a resolver problemas (especialmente estadísticos) y destacable compañero de viaje.

Gracias a mi viejo por inculcarme el amor inmensurable por la ciencia y el bicherío, y a mi vieja por mostrarme con el ejemplo lo que es estudiar. A ambos por el sinfín de comidas tardías post cursada, por soportarme preparando los finales y escribiendo.

Gracias a mi abuela Gloria, personificación del cariño y demostración indiscutible de que la voluntad es condición necesaria (aunque no suficiente) para transitar los caminos que queremos.

Gracias a mis afectos, muchos de los cuales no tienen distinción clara entre familia y amigos. Gracias especiales a Meli y Cami, colegas pero amigas desde mucho antes. Gracias a Iturbe por recordarme las cosas importantes siempre. Gracias a Nati y Sofi, pilares fundamentales.

Gracias eternas a toda la comunidad de Exactas. Estudiantes, profesores, colegas, amigos. Volvería a elegir esta Facultad y a esta carrera todas las veces que hubiera que hacerlo.

Introducción

La contaminación química como amenaza para la biodiversidad

La biodiversidad constituye un sistema dinámico que facilita la resiliencia y la funcionalidad de los ecosistemas. Esta riqueza biológica comprende la variabilidad genética, de especies y de caracteres funcionales (Cardinale, 2012). Juega un papel crucial en la prestación de servicios ecosistémicos claves, como la producción de biomasa, el funcionamiento de procesos biogeoquímicos esenciales, y la adaptación y resiliencia frente a cambios ambientales (Duffy, 2009; Correa y Pérez-Torres, 2016; Pires et al., 2018).

La falta de sustentabilidad de las actividades del ser humano representa un peligro para la integridad del planeta y su capacidad de proveer estos servicios ecosistémicos (Johnson et al., 2017). La degradación de hábitats, la fragmentación del paisaje y otros impactos de la actividad antrópica favorecen la pérdida continua de especies a tasas progresivamente aceleradas (IPBES, 2019; Almond et al., 2020; Persson et al., 2022). La conservación de la biodiversidad es fundamental para garantizar el equilibrio a largo plazo del medio ambiente y su capacidad para responder a estos desafíos emergentes (Lenzi et al., 2023).

Entre los efectos antrópicos previamente mencionados, la contaminación química, producto de la liberación desregulada de compuestos químicos en diversos compartimentos ambientales, constituye una preocupación crítica en la actualidad. En el presente, existen más de 350.000 productos químicos y mezclas de productos químicos registrados para su producción y empleo (Wang et al., 2020) y se prevé que la producción se haya triplicado entre los años 2010 y 2050 (EEA, 2018). Junto con la degradación del hábitat, la explotación directa de los organismos, el cambio climático y las especies exóticas invasoras, la contaminación química es señalada actualmente como una de las principales causas de la pérdida de biodiversidad a escala global (IPBES, 2019; Jaureguiberry et al., 2022; Sylvester et al., 2023). Esta forma de contaminación, derivada principalmente de actividades industriales, agrícolas y domésticas, introduce en el medio ambiente una variedad de sustancias que pueden tener impactos devastadores en los ecosistemas y la salud humana (Pure Earth y Green Cross Switzerland, 2016; UNEP, 2019; Laffoley y Baxter, 2019; Cribb, 2021; Naidu et al., 2021) ya que pueden persistir en el aire, el suelo y el agua durante períodos prolongados, afectando la calidad de los recursos naturales esenciales (Hemond y Fechner-Levy, 2015; Gruber, 2018). Los contaminantes químicos forman parte de las denominadas “nuevas entidades” (Steffen et al., 2015), definidas como las sustancias y sus productos de transformación, producidas por el ser humano tanto de forma

intencionada como impremeditada, así como los elementos naturales que se recirculan artificialmente o a tasas más altas como producto de la influencia humana. Son nuevas en un sentido geológico, ya que son creadas, introducidas o recirculadas en el ambiente como fruto de la actividad antrópica (Persson et al., 2022). La contaminación química, o las nuevas entidades, han sido incluídas como uno de los procesos antropogénicos dentro del marco de los “límites planetarios”, los cuales definen el espacio operativo seguro para la humanidad con respecto a la integridad del planeta (Rockström et al., 2009). Los límites planetarios constituyen un concepto crucial en la comprensión de los desafíos que enfrenta la humanidad en relación con el medio ambiente y la sostenibilidad (Richardson et al., 2023). Estos límites representan los puntos críticos en los sistemas de la Tierra, más allá de los cuales existe el riesgo de un cambio irreversible en los procesos que regulan su funcionamiento (Rockström et al., 2009). Se relacionan estrechamente con la capacidad de los sistemas naturales para regenerarse y mantener el equilibrio. Cuando se supera este límite, se ejerce una presión adicional sobre los recursos naturales, lo que puede llevar a la degradación ambiental, la pérdida de hábitats y la escasez de recursos vitales como el agua y los alimentos (Steffen et al., 2015). En este sentido, Persson et al. (2022) han sugerido recientemente que la humanidad ha excedido el espacio operativo seguro del límite planetario para las nuevas entidades, ya que la producción y las emisiones anuales de sustancias químicas están aumentando a un ritmo que supera la capacidad global de evaluación y monitoreo.

La vulnerabilidad de la biodiversidad ante la contaminación química se manifiesta en múltiples niveles, desde la alteración de procesos fisiológicos en organismos individuales hasta la disrupción de interacciones tróficas y la disminución de la resiliencia de los ecosistemas frente a cambios ambientales (Clements y Rohr, 2009). Además, la contaminación química presenta riesgos considerables para la salud humana, ya sea por exposición directa como a través de la cadena alimentaria (Asante-Duah, 2002; Thompson y Darwish, 2019; Soleman et al., 2020; Hu et al., 2021; Mathiesen et al., 2021; Naidu et al., 2021).

Los fármacos como contaminantes emergentes

El incremento de los contaminantes emergentes se configura como un desafío destacado en el panorama de la contaminación ambiental contemporánea. Estos contaminantes, asociados con actividades industriales, agropecuarias y domésticas, representan una categoría diversa de sustancias químicas que no se abordan de manera exhaustiva en las regulaciones ambientales convencionales (Geissen et al., 2015; Richardson y Kimura,

2017). Este grupo de contaminantes incluye productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, plaguicidas, productos químicos industriales y otros compuestos sintéticos que, debido a su uso generalizado, han comenzado a detectarse en diversas matrices ambientales (Pal et al., 2010; Tang et al., 2019). La liberación continua de este tipo de sustancias, principalmente en cuerpos de agua, ha llevado a su distribución ubicua en los ecosistemas, que trasciende fronteras geográficas y temporales (Hemond y Fechner-Levy, 2015; Naidu et al., 2021; Da Silva et al., 2023).

A diferencia de los contaminantes convencionales, no existe en la actualidad una comprensión completa sobre la toxicidad, el comportamiento ambiental y los efectos a largo plazo de estos contaminantes emergentes (Patel et al., 2020). Esto plantea interrogantes significativos para la evaluación y gestión de riesgos (Peña-Guzmán et al., 2019; Tang et al., 2019; Zhou et al., 2019). Frente a la presencia de medicamentos y productos químicos de uso diario en cuerpos de agua, suelos e incluso en el aire, es imperativa la necesidad de investigar y abordar estos contaminantes emergentes para proteger la salud humana y la integridad de los ecosistemas.

La contaminación de los sistemas acuáticos con fármacos de uso humano y veterinario ha emergido como un fenómeno alarmante y complejo en el escenario actual del estudio de la calidad del agua. Estos contaminantes encuentran su camino hacia los cuerpos de agua durante el proceso de producción, el uso cotidiano y el descarte, y han ganado particular atención debido a su persistencia en el medio ambiente y sus potenciales efectos adversos en los ecosistemas acuáticos y la salud humana (Pal et al., 2010; Arnold et al., 2014; Mezzelani et al., 2018; Vasilachi et al., 2021; Wilkinson et al., 2022; Khan y Barros, 2023; Zhang et al., 2023).

El vertido constante en ríos y arroyos de efluentes urbanos que contienen una mezcla diversa de compuestos farmacéuticos ha llevado a la presencia generalizada de estos contaminantes en los sistemas acuáticos (Pal et al., 2010; Bell et al., 2011). En un estudio reciente, se detectaron 61 principios activos de productos farmacéuticos en 258 ríos del mundo a partir de muestreos realizados en 104 países de todos los continentes (Wilkinson et al., 2022). Desde analgésicos y antidepresivos hasta antibióticos, estos fármacos ingresan en forma directa al ambiente acuático a través de los efluentes domésticos, hospitalarios y de la industria farmacéutica, dado que los tratamientos convencionales en las plantas depuradoras de aguas residuales no suelen ser efectivos para su remoción (Jelic et al., 2012; Radwan et al., 2023; Kumar et al., 2023)(Figura 1).

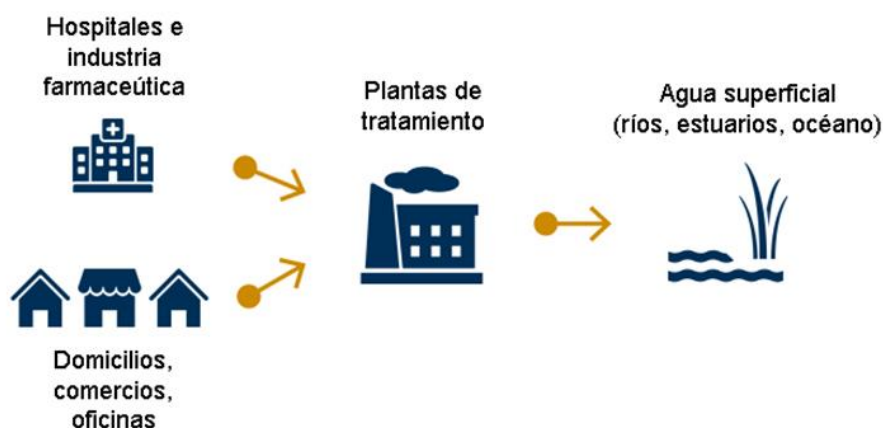


Figura 1. Vías de acceso de los fármacos de uso humano hacia los ambientes acuáticos. Modificado de Niemi et al., 2020.

El impacto de los fármacos en los ecosistemas acuáticos es multifacético y complejo, debido a su capacidad para perturbar las dinámicas ecológicas (Silva et al., 2012; Ghazal, 2023). La exposición continua a bajas concentraciones de estos compuestos ha demostrado tener efectos adversos en organismos acuáticos, incluyendo cambios en la fisiología, la reproducción y el comportamiento, alterando sus patrones de respuesta al entorno (Brodin et al., 2014; Richardson y Kimura, 2017; Khan y Barros, 2023; Moreno-Pérez et al., 2023; Yuan et al., 2023).

La investigación continua sobre la presencia y los efectos de estos contaminantes, así como la implementación de medidas regulatorias específicas, son cruciales para mitigar los riesgos asociados y preservar la calidad del agua en el contexto de una creciente presión antropogénica (Pal et al., 2010). La comprensión de los mecanismos a través de los cuales los productos farmacéuticos afectan los cuerpos de agua no solo es esencial para la preservación de la biodiversidad acuática, sino también para salvaguardar la salud humana, dado que estos cuerpos de agua son fuentes críticas de abastecimiento de agua potable (Lei et al., 2015; Naidu et al., 2021).

Fluoxetina

Dentro de los fármacos de uso humano, la fluoxetina (FLX) (Figura 2) se destaca como uno de los antidepresivos más ampliamente prescritos, habiéndose consolidado como un fármaco crucial en el tratamiento de la depresión y otros trastornos psiquiátricos a nivel mundial (Westenberg, 2009; Milea et al., 2010; Pei et al., 2016; DrugStats Database, 2019). Este fármaco pertenece a la clase de antidepresivos conocidos como inhibidores selectivos

de la recaptación de serotonina (ISRS), cuyo mecanismo de acción se centra en la modulación del sistema serotoninérgico, un componente esencial en la regulación del estado de ánimo y de diversas funciones neurobiológicas. En el sistema nervioso central, la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) es sintetizada en las neuronas presinápticas a partir del aminoácido triptofano y almacenada en vesículas. En respuesta a señales activadoras, la 5-HT es liberada hacia la hendidura sináptica, donde se une a los receptores de la membrana postsináptica, actuando de esta forma como neurotransmisor. Luego de activar a los receptores, la 5-HT ingresa nuevamente a través de los transportadores de serotonina presentes en la membrana presináptica, culminando de esta forma su acción. La FLX ejerce su efecto al unirse a los transportadores de 5-HT, impidiendo su recaptación (Figura 3). Esto produce un aumento de la concentración de 5-HT en el espacio sináptico, incrementando la activación de los receptores postsinápticos y, en última instancia, aliviando los síntomas depresivos como resultado del incremento de la señalización serotoninérgica (Fuller et al., 1991; Stahl 1998; Sghendo y Mifsud, 2012). Asimismo, la norfluoxetina, principal metabolito de la FLX, también puede actuar como ISRS, incluso con mayor potencia que el compuesto parental, prolongando su modo de acción (Fuller et al., 1991; Hiemke y Härtter, 2000).

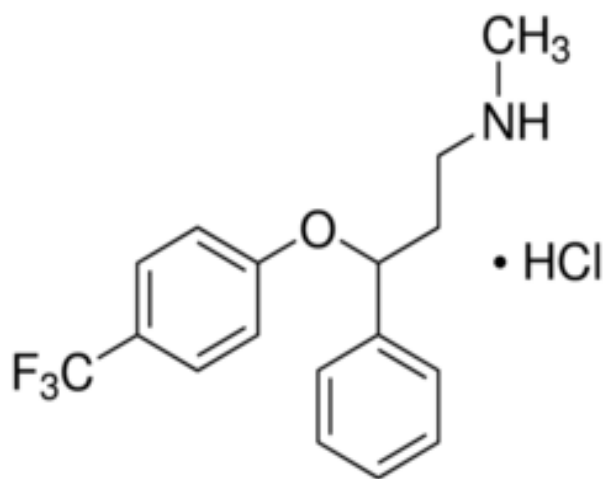


Figura 2. Estructura molecular de la FLX, comercializada como clorhidrato de fluoxetina.

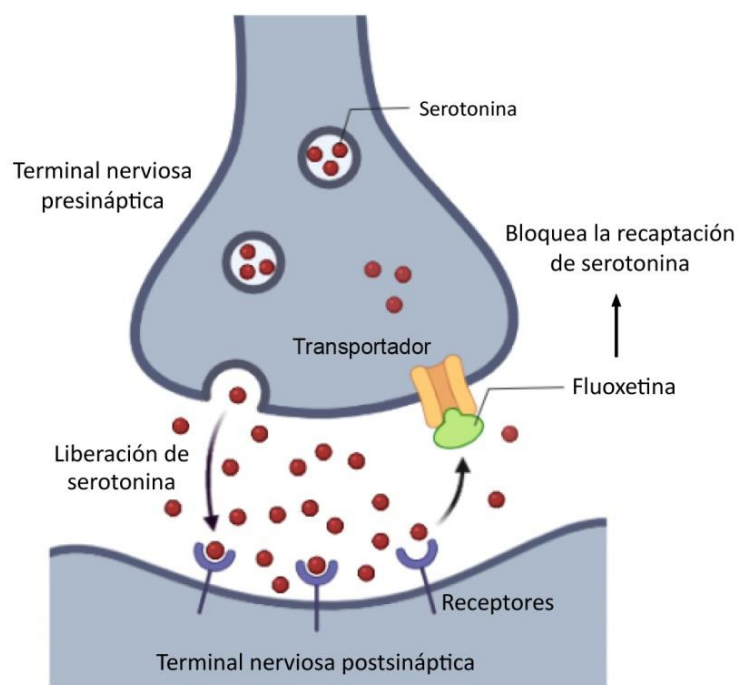


Figura 3. Mecanismo de acción de la FLX en el sistema nervioso central. La FLX se une a los transportadores de serotonina presinápticos impidiendo su recaptación, lo que resulta en un aumento de los niveles de serotonina en la hendidura sináptica, potenciando la señalización serotoninérgica. Tomado y modificado de Correia et al. (2023).

Dada su popularidad clínica, la FLX es ampliamente recetada y, como resultado, es detectada con elevada frecuencia, junto con otros fármacos neuroactivos, en cuerpos de agua de distintas regiones del planeta (ver Gould et al., 2021; Salahinejad et al., 2022; Correia et al., 2023). La FLX y su metabolito, norfluoxetina, se pueden encontrar en concentraciones que oscilan entre 0,4 ng/L y 3,6 µg/L en efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, entre 0,2 y 100 ng/L en aguas superficiales (con niveles de hasta 350-596 ng/L en sistemas que reciben la descarga de aguas residuales) y entre 0,5 y 0,8 ng/L en el agua potable (Metcalf et al., 2010; Hughes et al., 2013; Mole y Brooks, 2019; Gould et al., 2021; Salahinejad et al., 2022; Correia et al., 2023). En fase acuosa, la FLX es un compuesto estable y resistente a la fotólisis, con una vida media reportada de 112-133 días. Sin embargo, en el ambiente acuático, la FLX tiende a adsorberse rápidamente a los sedimentos, teniendo una vida media en fase acuosa que oscila entre 4,6 y 7,6 días (Kwon y Armbrust, 2006). Asimismo, se ha reportado bioacumulación de la FLX en peces capturados en cuerpos de agua que reciben la descarga de efluentes (Brooks et al., 2005; Schultz et al., 2010; Arnnok et al., 2017). Es esperable que los niveles de FLX en las distintas matrices ambientales aumenten en el futuro en virtud de la proyección de

incremento en la producción y consumo de este fármaco a nivel mundial (Data Bridge Market Research, 2022)(Figura 4).

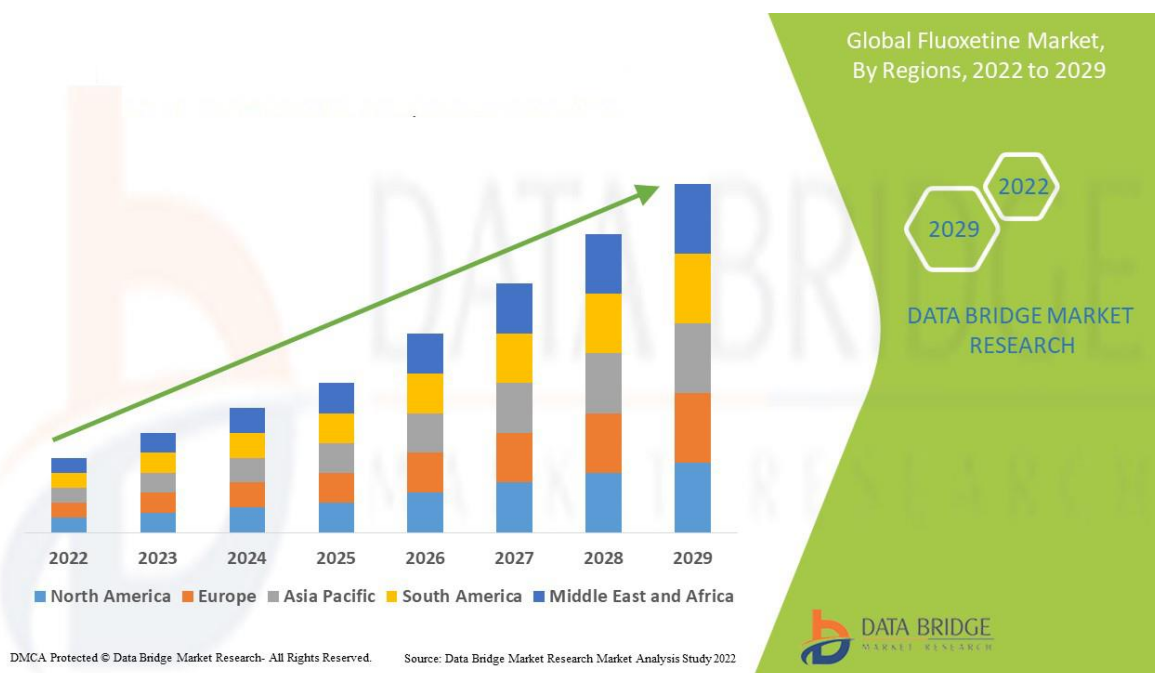


Figura 4. Proyección de la comercialización del fármaco fluoxetina entre los años 2022 y 2029. Tomado de Data Bridge Market Research market analysis study (2022).

La presencia de FLX en los cuerpos de agua plantea inquietudes respecto de su impacto sobre los organismos acuáticos. Al tratarse de un medicamento que actúa modulando el sistema serotoninérgico, el cual se encuentra muy conservado a lo largo de la evolución de los metazoos (Hay-Schmidt, 2000; Lillesaar, 2011), preocupa la posibilidad de que este fármaco afecte a organismos no blanco, como peces y otros organismos acuáticos, que comparten mecanismos fisiológicos y neuroquímicos con los seres humanos (Christen et al., 2010; Correia et al., 2023). Diversos estudios ecotoxicológicos han evaluado los efectos de este fármaco en una variedad de especies acuáticas, tanto de invertebrados como vertebrados. En dichos estudios se ha reportado modulación de los niveles de serotonina y cambios a nivel morfológico, fisiológico, neuroendocrino, reproductivo y del comportamiento como resultado de la exposición a concentraciones variables de FLX, del orden de los ng/L a los µg/L (ver Gould et al., 2021; Salahinejad et al., 2022; Correia et al., 2023). Sin embargo, muchos de los estudios realizados tienen limitaciones y parece poco probable que todos los efectos informados sean repetibles, o incluso reportan resultados aparentemente contradictorios, por lo que no es posible determinar con certeza qué concentraciones ambientales de FLX suponen un riesgo para los organismos acuáticos (Sumpter et al., 2014). Por otro lado, aunque las concentraciones de FLX en los ambientes acuáticos son

generalmente inferiores a los umbrales para los cuales se han reportado efectos adversos, los organismos no blanco suelen estar expuestos durante largos períodos de tiempo (que normalmente exceden los tiempos de exposición de los ensayos de laboratorio) a concentraciones variables de este y otros antidepresivos, lo que en definitiva podría provocar una serie de alteraciones como resultado de exposiciones crónicas (Grabicova et al., 2014; Parolini et al., 2019).

Entre los efectos hallados en peces, se ha reportado que la exposición a FLX bajo distintos diseños experimentales puede provocar bioconcentración en tejido el cerebral, muscular y hepático (Ramírez et al., 2009; Pan et al., 2018; Nowakowska et al., 2020; Yan et al., 2020), alterar los niveles de expresión génica, incluyendo genes del sistema monoaminérgico (Cunha et al., 2018; Parolini et al., 2019; Costa et al., 2021), reducir la ingesta y el crecimiento (Mennigen et al., 2009; de Farías et al., 2020; Duarte et al., 2020), alterar el metabolismo de la glucosa (Mennigen et al., 2010a), disminuir la fecundidad en hembras (Lister et al., 2009; Colville et al., 2022) y alterar el eje reproductivo en machos y hembras (Mennigen et al., 2010b, 2017; Schultz et al., 2011). Sin embargo, la mayoría de los estudios han centrado el análisis en los efectos de la FLX sobre el comportamiento de los peces. Esto se fundamenta en el hecho de que este fármaco ha sido diseñado para modular el comportamiento de los seres humanos y que sus vías de acción muestran un alto grado de conservación entre mamíferos y peces (Gunnarson et al., 2008). Por lo tanto, según la hipótesis de extrapolación (Rand-Weaver et al., 2013) es esperable que el efecto principal de la FLX en especies silvestres se registre a nivel de las respuestas comportamentales (Sumpter et al., 2014). En este sentido, los estudios realizados hasta el presente han reportado una amplia gama de efectos conductuales en distintas especies de peces teleósteos, como alteración del comportamiento reproductivo (Weinberger y Klaper, 2014; Bertram et al., 2018, 2020; Fursdon et al., 2019; Martin et al., 2019a; Wiles et al., 2020) y de forrajeo (Gaworecki y Klaine, 2008; Martin et al., 2019b; Thoré et al., 2020), disminución de la agresividad intraespecífica (Perreault et al., 2003; Dziewieczynski y Hebert, 2012; Kania et al., 2012; Kohlert et al., 2012; Barry, 2013; Forsatkar et al., 2014; Greaney et al., 2015; Ansai et al., 2016; Eisenreich et al., 2017; McCallum et al., 2017; Theodoridi et al., 2017) o aumento de la misma (McDonald et al., 2011; Weinberger y Klaper, 2014; Wolkers et al., 2016), atenuación del cuidado parental (Forsatkar et al., 2014; Greaney et al., 2015), efectos ansiolíticos (Egan et al., 2009; Ansai et al., 2016; Meijide et al., 2018; de Farías et al., 2020; Martin et al., 2020) o ansiogénicos (Saaristo et al., 2017; Thoré et al., 2020); reducción de la actividad natatoria (Kohlert et al., 2012; Winder et al., 2012; Barry, 2013; Meijide et al., 2018; Duarte et al., 2019; Huang et al., 2019; Yamindago et al., 2021; Correia

et al., 2022) y retardo o atenuación de la respuesta antipredatoria (Painter et al., 2009; Weinberger y Klaper, 2014; Pelli y Connaughton, 2015; Martín et al., 2017).

Por otro lado, existe evidencia de que la FLX puede actuar como disruptor neuroendócrino modificando los niveles plasmáticos de cortisol (Vera-Chang et al., 2018, 2019; Kar et al., 2021) y alterando la respuesta de estrés (De Abreu et al., 2014, 2015; Miranda et al., 2023). El cortisol es la principal hormona de estrés en peces y desempeña un papel esencial en la respuesta a desafíos ambientales (Sadoul y Geffroy, 2019; Alfonso et al., 2023). Esta hormona tiene influencia sobre el metabolismo, el crecimiento, la inmunidad, la reproducción y la osmorregulación (Mommensen et al., 1999; Milla et al., 2009; McDonald, 2017). El aumento de los niveles de cortisol en sangre activa mecanismos fisiológicos que le permiten a estos organismos hacer frente a factores desencadenantes de estrés, como lo son los contaminantes ambientales, y restablecer la homeostasis (Sadoul y Vijayan, 2016; Sadoul y Geffroy, 2019). Esta respuesta adaptativa depende de la activación del eje del estrés o hipotálamo-hipófisis-interrenal (Barton, 2002) que se encuentra altamente conservado en la evolución de los vertebrados, considerándose análogo al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal de mamíferos (Nesan y Vijayan, 2013; Sadoul y Geffroy, 2019). A su vez, el funcionamiento de estos ejes hormonales en vertebrados es modulado por la 5-HT (Winberg et al., 1997; Cerdá-Reverter y Canosa, 2009), por lo que resulta de especial interés el estudio del impacto de los ISRS sobre la regulación de la respuesta de estrés (Kreke y Dietrich, 2008; McDonald, 2017). La medición de los niveles plasmáticos de cortisol se configura como una herramienta adecuada para la estimación del grado de estrés en peces y para profundizar en el conocimiento sobre el impacto que pueden tener distintos contaminantes sobre la adaptabilidad de estos organismos a su entorno (Baker et al., 2013; Schreck y Tort, 2016; Sadoul y Geffroy, 2019; Lemos et al., 2023). Estos hallazgos no sólo tienen relevancia para comprender las dinámicas poblacionales e identificar alteraciones en los ecosistemas acuáticos, sino que podrían dilucidar distintos niveles de interconexión entre la salud humana, la salud animal y la sostenibilidad ambiental.

El comportamiento como biomarcador

La ecotoxicología se beneficia de enfoques que proveen rápidamente información confiable sobre la toxicidad y el impacto ambiental de los compuestos químicos. Tradicionalmente, la evaluación regulatoria de sustancias químicas se basa en estudios ecotoxicológicos en los que se analiza la mortalidad, el crecimiento, la reproducción y el desarrollo, considerando que estos parámetros de evaluación a nivel individual tienen una conexión directa con el impacto a nivel poblacional (ECA, 2011). El comportamiento es una respuesta integradora a

una gama de estímulos internos y externos (Levitis et al., 2009) que representa una herramienta especialmente sensible para evaluaciones ecotoxicológicas, a través del empleo de biomarcadores comportamentales (Melvin y Wilson, 2013; Brodin et al. 2014). Dichos biomarcadores se centran en las modificaciones observables y cuantificables del comportamiento de los organismos, proporcionando una vía específica para identificar alteraciones producidas por la exposición a los contaminantes ambientales (Brodin et al., 2014; Eissa y Ossana, 2021). En la actualidad, los biomarcadores comportamentales no son considerados en los procesos regulatorios a pesar de tener numerosas ventajas. Entre ellas, merece destacarse que el comportamiento: representa una respuesta integradora que conecta los procesos a nivel molecular y fisiológico con los procesos a nivel poblacional; resulta un indicador ecológicamente relevante ya que está directamente relacionado con el fitness, la supervivencia de los organismos y la dinámica poblacional; su expresión es sensible al estrés inducido por contaminantes y funciona como señal de alerta temprana, dado que las respuestas comportamentales suelen manifestarse a menores niveles de contaminación que los biomarcadores tradicionales; su sensibilidad a bajos niveles de exposición lo convierte en una herramienta valiosa para evaluar la toxicidad crónica y los efectos acumulativos a lo largo del tiempo; puede evaluarse en forma no invasiva, es relativamente económico de monitorear y es susceptible de cuantificación automatizada y de alto rendimiento (Amiard-Triquet, 2009; Hellou, 2011; Melvin y Wilson, 2013; Brander et al., 2015; Thoré et al., 2021). La importancia del comportamiento en los procesos de adaptación hace vital su estudio para comprender el impacto de los contaminantes en la salud de los ecosistemas (Peterson et al., 2017). En consecuencia, la ecotoxicología conductual ha ganado popularidad en la última década, especialmente en lo que respecta al monitoreo de productos farmacéuticos (Melvin y Wilson, 2013; Bertram et al., 2022). Esto ha llevado a que actualmente se promueva la incorporación de los biomarcadores comportamentales en los procesos de evaluación de riesgo de los productos químicos por parte de las autoridades regulatorias (Agerstrand et al., 2020; Ford et al., 2021).

Los biomarcadores comportamentales que suelen relevarse en los estudios ecotoxicológicos con peces incluyen la actividad locomotora o el desplazamiento, las interacciones sociales intraespecíficas como la agregación espacial, la agresión y el comportamiento reproductivo, y las interacciones interespecíficas como la búsqueda de presas y la respuesta anti-predatoria (Agerstrand et al., 2020). La actividad natatoria resulta un bioindicador especialmente práctico ya que se ve directamente afectada por estímulos externos (Eissa y Ossana, 2021). La respuesta locomotora influye en forma directa en el crecimiento y la supervivencia al afectar la capacidad de conseguir alimento o evadir predadores. A su vez, se conecta con procesos a mayor escala como la dispersión y la

migración (Agerstrand et al., 2020), por lo que es considerado un biomarcador de relevancia ecológica (Little y Finger, 1990). La agresión por competencia por recursos como el territorio, el alimento o el acceso a la reproducción es otro comportamiento con implicancias directas en el fitness individual y la dinámica poblacional. El comportamiento agresivo en el contexto de la competencia por alimento es un fenómeno común que puede observarse en diversas especies (Ward et al., 2006). Esta agresividad se manifiesta principalmente cuando los recursos alimentarios son limitados, provocando que los peces adopten estrategias ofensivas y defensivas para asegurar su supervivencia y optimizar la ingesta de nutrientes (Grant et al., 2002). Las agresiones pueden incluir persecuciones, mordiscos y despliegues visuales intimidantes, diseñados para disuadir a los competidores y establecer una jerarquía de dominancia. Este comportamiento no solo garantiza el acceso prioritario al alimento para los individuos más fuertes y dominantes, sino que también puede influir en la distribución espacial de los peces dentro de su hábitat, al forzar a los individuos subordinados a buscar recursos en áreas menos competitivas (Ward et al., 2006). En el estudio del impacto de fármacos neuroactivos que inhiben la recaptación de serotonina, la locomoción y la agresión resultan indicadores de relevancia por ser comportamientos naturalmente modulados por el sistema serotoninérgico (Winberg y Nilsson, 1993; Lillesaar, 2011; Winberg y Thornkvist, 2016; McDonald, 2017; Theodoridi et al., 2017).

Modelos experimentales

Los análisis ecotoxicológicos requieren de modelos experimentales apropiados para poder extraer conclusiones pertinentes y extrapolarlas a distintos grupos (Fields y Johnston, 2005; Thoré et al., 2021). En particular, los ensayos de exposición con organismos modelo permiten poner a prueba hipótesis sobre el impacto de diversos contaminantes y, a su vez, hacer extrapolaciones a otras especies o mismo al ecosistema en general (Segner y Bauman, 2016; Thoré et al., 2021).

Los peces teleósteos son ampliamente utilizados como modelos experimentales en ensayos de ecotoxicidad (Norrgrén, 2012). Dado que muchos mecanismos de toxicidad y respuestas a compuestos químicos son conservados evolutivamente, los efectos suelen ser similares en las distintas especies y análogos a los observados en otros vertebrados (Thoré et al., 2021). Asimismo, en virtud de su alto grado de homología con los seres humanos, el uso de los peces en estudios genéticos, neurológicos, conductuales y ecotoxicológicos permite comprender cómo los productos químicos pueden afectar la salud humana y, por lo tanto, intentar minimizar los efectos adversos (Correia et al., 2023). En particular, dentro de los peces teleósteos, las especies de la familia Poeciliidae se suelen utilizar para una amplia

gama de investigaciones biológicas, ambientales y ecotoxicológicas (Norrgrén, 2012; Boaru et al., 2021; Safian et al., 2021).

Cnesterodon decemmaculatus

C. decemmaculatus (Jenyns, 1842) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae), comúnmente conocida como madrecita, es una especie nativa de Sudamérica, que se distribuye en Argentina, Uruguay y el sur de Brasil (Lucinda, 2005). Es un pez de pequeño tamaño con marcado dimorfismo sexual. Los machos son más pequeños que las hembras y presentan una aleta anal modificada en un órgano intromitente o gonopodio (Figura 4A). En Argentina, la distribución de la madrecita se extiende por diversas cuencas, abarcando desde el norte del país hasta la provincia de Buenos Aires, con especial abundancia en la región pampeana (Almirón et al., 1992; Lucinda, 2005).

C. decemmaculatus es conocido por ser un pez gregario y natatoriamente activo que se alimenta predominantemente de pequeños invertebrados acuáticos y material vegetal. Es una especie ovovivípara con alta capacidad reproductiva, tiempo de crecimiento corto y rápido reemplazo generacional. Esta estrategia reproductiva contribuye a su supervivencia en entornos acuáticos variables (Ferrari et al., 2017).

C. decemmaculatus es capaz de adaptarse a condiciones ambientales muy variables con un grado de tolerancia comparativamente mayor al de otras especies, por lo que es encontrada tanto en ambientes prístinos como altamente degradados (Hued y Bistoni, 2005). Además, es un especie de fácil mantenimiento en el laboratorio (Ferrari et al. 2017), por lo que es considerada un buen modelo experimental en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico (De la Torre et al., 2007; Vidal et al., 2018). En Argentina, esta especie se encuentra entre las recomendadas para la realización de bioensayos de toxicidad por las normas IRAM (Instituto Argentino de Normatización y Certificación) (IRAM, 2008) y ha sido ampliamente empleada como organismo de ensayo para la evaluación del impacto de distintos tipos de contaminantes, incluyendo metales (Gómez et al., 1998; Baudou et al., 2017; Ferro et al., 2019; González Núñez et al., 2022), plaguicidas (Menéndez-Helman et al., 2012; Vera-Candiotti et al., 2014; Paracampo et al., 2015; Bonifacio et al., 2016, 2020; Bernal-Rey et al., 2017, 2020; Pautasso, 2017; Arcuate Ruiz et al., 2019) y fármacos analgésicos (Campos et al., 2023), así como especie bioindicadora de la calidad del agua de ríos periurbanos (De la Torre et al., 2005; Ossana et al., 2016, 2019; Vidal et al., 2018; Zambrano et al., 2018; Baudou, 2019).

Gambusia holbrooki

G. holbrooki Girard, 1859 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae), comúnmente conocido como gambusia o pez mosquito oriental, es una especie originaria de las cuencas de la costa este de Estados Unidos (Rauchenberger, 1989; Pyke, 2008). Tanto *G. holbrooki* como su especie hermana, el pez mosquito occidental *G. affinis*, han sido introducidas en diversos ambientes acuáticos como agentes de control biológico de mosquitos, al alimentarse de sus larvas. Como consecuencia, el área de distribución de ambas especies se ha expandido a nivel mundial, ocupando actualmente todos los continentes excepto la Antártida (García-Berthou et al., 2005; Vidal et al., 2010; Srean, 2015).

Al igual que otros poecílidos, *G. holbrooki* es un pez de pequeño tamaño con marcado dimorfismo sexual (Figura 4B). Se lo encuentra en aguas dulces, desde arroyos hasta lagos, en zonas poco profundas, con escasa corriente y presencia de vegetación (Pyke, 2005, 2008). En términos de comportamiento social, el pez mosquito es conocido por su habilidad para formar grupos laxos y fluctuantes, capaces de responder rápidamente a cambios en el entorno y adaptarse a una variedad de condiciones ambientales (Pyke, 2008; Srean, 2015). Estos cardúmenes temporales a menudo se congregan en aguas superficiales para buscar alimento, el cual es altamente variable e inespecífico, pudiendo alimentarse de pequeños invertebrados, larvas de peces y material vegetal (Blanco et al., 2004; Pyke, 2005). Los machos de *G. holbrooki* son conocidos por su territorialidad, especialmente durante la época de reproducción, en la que defienden activamente sus territorios contra otros machos (Martin, 1975; Thresher et al., 2013). Este comportamiento agresivo puede tener implicancias tanto en la dinámica poblacional de la especie como en la ecología del ecosistema acuático en el que se encuentra, ya que la competencia intensa puede afectar a otras especies nativas, alterando así el equilibrio natural del ecosistema (Higgins, 2021). A nivel de la reproducción, el pez mosquito es conocido por su estrategia ovovivípara. Las hembras dan a luz crías bien desarrolladas, lo cual, combinado con su capacidad para adaptarse a condiciones ambientales muy diversas, ha llevado a un rápido aumento de las poblaciones en las áreas donde fue introducida (Pyke, 2005, 2008; Wilson et al., 2010).

La naturaleza activa del pez mosquito y su estrategia reproductiva prolífica, junto con su capacidad para prosperar en condiciones adversas y resistir perturbaciones ecológicas, ha contribuido a su éxito como especie invasora en diversas regiones del planeta (Pyke, 2008; Srean, 2015) planteando diversos desafíos en términos de conservación y gestión de ecosistemas acuáticos locales (Pyke, 2008; Alcaraz y García-Berthou, 2007). En Argentina, el pez mosquito fue introducido en 1943 para controlar la malaria (Ringuelet et al., 1967) y

actualmente es encontrado en diferentes cuerpos de agua del centro y norte del país, donde comparte el hábitat con otras especies nativas de Cyprinodontiformes con adaptaciones ecológicas similares. Esto supone un riesgo para los ecosistemas autóctonos y la conservación de la biodiversidad local ya que se ha comprobado que el pez mosquito puede reducir drásticamente la supervivencia de las larvas de otras especies (Laha y Mattingly, 2007). De hecho, al igual que en otras regiones del mundo donde fue introducida, el área de distribución de *G. holbrooki* en Argentina ha aumentado en los últimos años, llegando a superar en abundancia a las especies nativas en diversos ambientes (Cabrera et al., 2017; Andreoli Bize y Fernández, 2019).

El uso de *G. holbrooki* en estudios ecotoxicológicos se remonta a varias décadas, siendo una especie seleccionada como modelo experimental para evaluar el impacto de sustancias químicas en los ecosistemas acuáticos a través del uso de distintos biomarcadores (Howell et al., 1980; Cabral et al., 1999; Toft et al., 2003; Nunes et al., 2008; Bernal-Rey et al., 2017, 2020; Scott et al., 2017) incluyendo los comportamentales (Martin et al., 2017, 2019a, 2019b, 2020; Bertram et al., 2018; Meijide et al., 2018).

En Argentina, las madrecitas, al igual que los peces mosquito, se distribuyen en un amplio rango geográfico y a menudo comparten el hábitat en ambientes cercanos a centros urbanos, donde es probable la presencia de fármacos. Por lo tanto, estas especies representan organismos ecológicamente relevantes para evaluar los efectos de la FLX, empleando el comportamiento como biomarcador de efecto sensible a la exposición a este compuesto neuroactivo. A su vez, la comparación de la respuesta en ambas especies permitiría estimar el grado de susceptibilidad de una especie nativa frente a una especie exótica en un contexto de contaminación acuática por fármacos.

Teniendo en cuenta las características biológicas de *G. holbrooki*, las cuales la hacen altamente competitiva y la definen como una especie invasora dominante en la mayoría de los hábitats, su amplia distribución en cuerpos de agua de Argentina y su cercanía filogenética y similitud ecológica con *C. decemmaculatus*, se seleccionó a esta especie para evaluar la susceptibilidad diferencial de ambos organismos frente a la exposición a FLX.

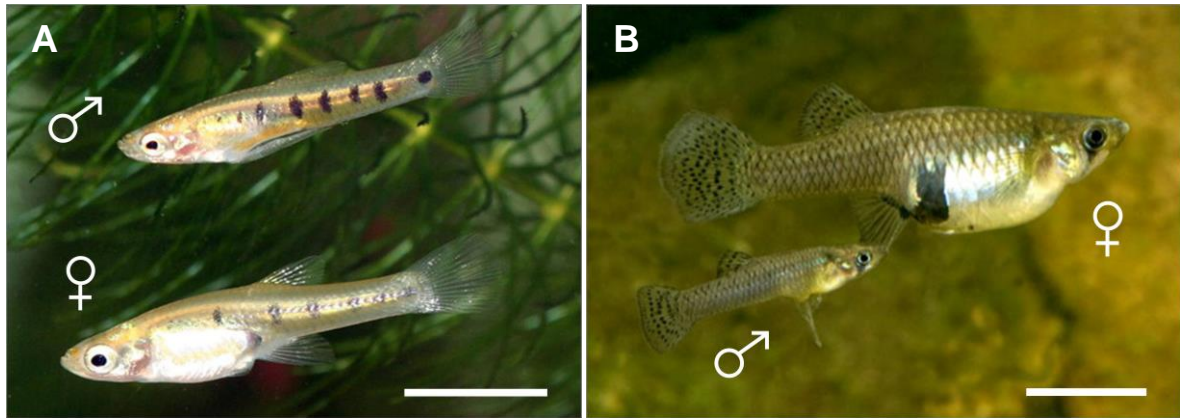


Figura 5. Imágenes representativas de individuos de ambos sexos de la madrecita *C. decemmaculatus* (A) y el pez mosquito *G. holbrooki* (B). Barra=1cm.

Objetivos e hipótesis

El **objetivo general** de este trabajo de tesis fue evaluar los efectos de la exposición subletal al fármaco antidepresivo FLX sobre el comportamiento de peces de agua dulce, utilizando como modelos experimentales dos especies de poecílidos, una especie nativa, la madrecita *C. decemmaculatus* y una especie exótica, el pez mosquito *G. holbrooki*.

Las **hipótesis** de trabajo planteadas fueron las siguientes:

1. La exposición a FLX modifica la dinámica de las interacciones agresivas entre coespecíficos de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki*, y este efecto es dependiente de la presencia de alimento.
2. La exposición a FLX altera la actividad natatoria de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki*.
3. La exposición a FLX produce una modificación de los niveles endógenos de cortisol en ambas especies.
4. Los parámetros comportamentales y fisiológicos analizados muestran una respuesta concentración-dependiente.
5. La respuesta a la exposición a FLX en relación a los parámetros analizados difiere entre ambas especies.

Para poner a pruebas estas hipótesis se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar el efecto de la exposición a FLX sobre el comportamiento agresivo de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki* en ausencia y presencia de alimento.
2. Evaluar el efecto de la exposición a FLX sobre la actividad natatoria de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki*.
3. Determinar los niveles de cortisol en ejemplares de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki* expuestos a FLX.
4. Establecer si la respuesta en los parámetros analizados es dependiente de la concentración de FLX.
5. Establecer si la respuesta a la exposición a FLX difiere entre ambas especies.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ejemplares de madrecita *C. decemmaculatus* provenientes de la Estación Hidrobiológica de Chascomús (Subsecretaría de Actividades Pesqueras, Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires) y ejemplares de pez mosquito *G. holbrooki* provenientes del Laboratorio de Aguas Continentales (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura; Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca; Ministerio de Economía de la Nación), ubicado en Costanera Sur (CABA). Los sitios de colecta para ambas especies corresponden a ambientes restringidos seminaturales considerados libres de contaminación de origen antrópico. Los peces fueron trasladados al Bioterio de Animales No Tradicionales de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), donde fueron alojados para su aclimatación en acuarios de 70 L, con agua de red declorada, bajo condiciones naturales de luz y temperatura.

Los experimentos de esta tesis fueron realizados siguiendo los lineamientos de la guía para el cuidado y uso de los peces en la investigación científica del Consejo Canadiense para la Protección Animal (CCAC, 2005), la guía de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA, 2020) y en conformidad con los principios éticos de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la FCEyN (protocolo 103/2018). El descarte de animales y agua fue realizado siguiendo las normas del Servicio de Higiene y Seguridad de la FCEyN.

Bioensayos de laboratorio

Se realizaron en total seis ensayos, tres para cada especie. Los ensayos realizados con *C. decemmaculatus* se identificaron como E1, E4 y E6, mientras que los realizados con *G. holbrooki* se identificaron como E2, E3 y E5. Para realizar los ensayos, se seleccionaron hembras adultas de ambas especies. No se emplearon machos a fin de evitar el acoso hacia a las hembras, lo cual podría haber afectado algunos de los comportamientos evaluados (Meijide et al., 2018). En la Tabla 1 se indican los rangos de tamaño y peso de los ejemplares empleados en cada ensayo. Una semana antes de iniciar los ensayos, los peces fueron acondicionados en acuarios de vidrio de 4 L con agua de red filtrada (pH 7,2-7,4; conductividad 350 μ S/cm y O₂ disuelto 5 mg/L), a temperatura de 25 \pm 1°C y fotoperiodo de 12:12h luz:oscuridad. Los individuos (n=5 por acuario) fueron expuestos durante 14 días a las siguientes concentraciones nominales de FLX: 0 μ g/L (control); 0,5 μ g/L; 5 μ g/L y 25

µg/L. Se colocaron paneles opacos entre los acuarios a fin de aislar visualmente los individuos de cada tratamiento (Figura 6). No se realizaron réplicas de los tratamientos debido a la imposibilidad de contar con un número suficiente de ejemplares de tamaño uniforme. Las concentraciones de ensayo abarcaron desde niveles ambientalmente relevantes del fármaco (Metcalf et al., 2010; Gould et al., 2021; Salahinejad et al., 2022) hasta niveles que producen en los peces expuestos una concentración plasmática comprendida dentro del rango terapéutico para humanos (Margiotta-Casaluci et al., 2014). La exposición se efectuó bajo un diseño semiestático con renovación diaria del volumen total de los acuarios. Cada semana se preparó una solución madre de 100 µg/mL de clorhidrato de FLX (pureza 99%, Droguería Saporiti) en agua deionizada, la cual fue almacenada en oscuridad a 4°C. Los recambios de las soluciones de ensayo se realizaron al mediodía, agregando a cada acuario la cantidad de solución necesaria para obtener la concentración final de FLX deseada. En el momento de los recambios, los acuarios fueron rotados sobre el estante a fin de evitar un efecto posición. Los peces se alimentaron una vez al día con nauplii de *Artemia sp.* suministrados 15 min antes de la renovación de las soluciones de ensayo. Al comenzar la exposición, cada tratamiento fue iniciado en un día distinto de la semana. Del mismo modo, el fin de la exposición, los registros comportamentales y la toma de muestras para cada tratamiento tuvo lugar en días distintos consecutivos (Figura 7). Este esquema fue empleado a fin de realizar los registros y la toma de muestras en una misma franja horaria, contemplando de este modo un posible efecto de variación circadiana de los parámetros analizados.

Tabla 1. Largo estándar (LE) y peso de los ejemplares de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki* empleados en los ensayos.

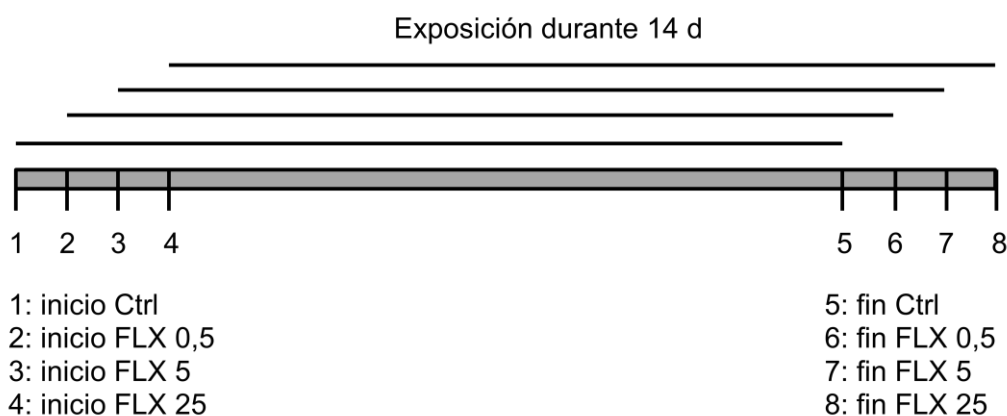
Ensayo	Especie	Rango de LE (mm)	Rango de peso (mg)
E1	<i>C. decemmaculatus</i>	22,0 - 29,5	180 - 390
E2	<i>G. holbrooki</i>	27,0 - 30,5	330 - 410
E3	<i>G. holbrooki</i>	25,5 - 29,5	277 - 429
E4	<i>C. decemmaculatus</i>	21,5 - 27,0	150 - 296
E5	<i>G. holbrooki</i>	21,5 - 26,0	142 - 262
E6	<i>C. decemmaculatus</i>	20,0 - 26,5	145 - 280



Figura 6. Acuarios empleados para la exposición de los peces a FLX.

Ensayos E1-E4

Una vez finalizado el período de exposición en los ensayo E1-E4, se registró en primer lugar el comportamiento agresivo entre coespecíficos, luego la actividad natatoria individual, y finalmente se procesaron los ejemplares a fin de obtener las muestras para medición de los niveles de cortisol (Figura 7).



Registros y muestreo al finalizar cada tratamiento:

- Registro de interacciones agresivas prealimentación (10 min)
- Registro de interacciones agresivas postalimentación (10 min)
- Acondicionamiento en acuario individual (90 min)
- Registro de actividad natatoria individual (5 x 10 min)
- Eutanasia, registro de LE y peso, obtención de muestras para medición de cortisol (5 x 15 min)

Figura 7. Esquema temporal de la organización de los ensayos E1-E4.

Registros comportamentales

Para evaluar el comportamiento agresivo, se realizaron registros de video de 10 min de duración, antes e inmediatamente después de alimentar a los peces con nauplii de *Artemia sp.*, suministrados en una cantidad tal que se garantizó la presencia de alimento durante el tiempo de grabación. A partir de estos registros, se cuantificaron los siguientes parámetros de agresión: latencia hasta la primera interacción agresiva, número total de interacciones agresivas y duración total de las interacciones agresivas. Las interacciones agresivas fueron clasificadas como embestidas o ataques (el pez agresor embiste a otro pez pero éste no responde o responde mediante un movimiento evasivo instantáneo), persecuciones (el pez agresor persigue a otro pez que responde mediante la huida) y peleas (el pez agresor es enfrentado por el pez atacado, estableciéndose una pelea entre ambos). Para registrar la duración de estas conductas, solo se consideraron las persecuciones y las peleas ya que las embestidas son conductas instantáneas con duración prácticamente nula. Estos parámetros se cuantificaron a partir de la observación directa de cada video tantas veces como fuera necesario para obtener los registros de las interacciones agresivas durante los 10 min de grabación.

Luego de efectuar los registros de agresión, cada pez fue transferido a un acuario individual conteniendo 6 L de la misma solución que había sido empleada durante el período de exposición. Luego de 90 min de acondicionamiento en el acuario de registro, cada pez fue filmado durante 10 min con el fin de evaluar su actividad natatoria (Figura 8). Los videos obtenidos fueron analizados con el software Ethovision XT 12.0 (Noldus, Países Bajos), mediante el cual se cuantificaron los siguientes parámetros de locomoción: distancia recorrida, velocidad promedio, tiempo en movimiento, tiempo estático, tiempo en cada tercio de la columna de agua. En todos los casos, los registros comportamentales se realizaron en un espacio aislado y libre de perturbaciones.



Figura 8. Registro de la actividad natatoria individual mediante videograbaciones.

Luego de registrar la actividad natatoria, los peces fueron secuencialmente sometidos a eutanasia por inmersión en un baño de agua con hielo durante 15 min (AVMA, 2020). A continuación, se registró el LE y el peso de cada individuo y se procedió a su decapitación. Finalmente, el cuerpo de cada ejemplar, excluyendo la aleta caudal, fue colocado en un tubo eppendorf y conservado en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para determinación de los niveles de cortisol.

Ensayos E5 y E6

Una vez finalizado el período de exposición en los ensayo E5 y E6, se registró el comportamiento agresivo entre coespecíficos del mismo modo indicado anteriormente. A continuación, los ejemplares fueron sometidos a eutanasia y procesados a fin de obtener las muestras para medición de los niveles de cortisol. Es decir que, a diferencia de los ensayos E1-E4, no se registró la actividad natatoria individual en estos dos ensayos (Figura 9).

Para la extracción de los esteroides, se realizaron homogenatos de las muestras en PBS 0,05 M (pH 7,4) y se procedió mediante el siguiente protocolo:

- En un tubo de vidrio, homogeneizar el cuerpo del pez en 500 µL de buffer PBS 0,05 M (pH 7,4).
- Agregar cinco veces el volumen de éter etílico (2,5 mL) y vortexear durante 30 seg en el tubo con tapa.
- Colocar el tubo en una gradilla y llevar a freezer a -20°C durante 30 min.
- Separar la fase líquida (éter conteniendo esteroides) en un tubo limpio.
- Agregar a la fase sólida 2,5 mL de éter y repetir los pasos anteriores.
- Colocar el tubo de extracción con los dos volúmenes de fase líquida en campana y dejar evaporar hasta el día siguiente.
- Resuspender el remanente en 250 µL de buffer PBS 0,05 M.

Los niveles de cortisol en los extractos se cuantificaron utilizando kits de ELISA comerciales (DRG Instruments®, Alemania). La determinación de la absorbancia se realizó en una lectora de microplacas Polastar Omega (BMG Labtech, Alemania). El límite de detección de la técnica fue de 1,8 ng/mL. Todas las muestras se cuantificaron por duplicado y se descartaron aquellas en las que el coeficiente de variación fue mayor que el 20%. Los valores de absorbancia de los patrones provistos en el kit se ajustaron a una curva logística de cuatro parámetros, a partir de la cual se determinó la concentración de cortisol en las muestras. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 7,11% y 15,6%, respectivamente. Para estimar el porcentaje de recuperación de cortisol, se agregó una cantidad conocida del esteroide a una muestra de un pez control no empleado en los ensayos y se realizó el mismo procedimiento de extracción y cuantificación por ELISA, obteniéndose un valor del 63%.

Verificación analítica de la concentración de FLX

Con el fin de estimar los niveles de FLX en el agua de los acuarios, se determinó la concentración del fármaco mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa acoplada a un detector de fluorescencia. Para ello, se tomaron muestras de agua por duplicado a partir un acuario con concentración nominal de 25 µg/L de FLX, con 5 ejemplares del pez mosquito *G. holbrooki*, bajo las mismas condiciones empleadas en los ensayos. Las muestras fueron tomadas inmediatamente después del agregado de la solución madre de FLX (tiempo 0) y luego de 24 h (frecuencia de renovación del medio). Asimismo, se tomaron muestras de agua de un acuario control que carecía de FLX. Las

muestras se trataron mediante extracción en fase sólida en cartuchos de C18 (Thermo Scientific, USA) seguida de elución con metanol acidificado (1% de ácido acético glacial). Los extractos fueron inyectados en un equipo de HPLC Thermo Separation P200 (Thermo Scientific, USA) acoplado a un detector de fluorescencia Linear LC-305 (Linear Instruments, USA). Se empleó una columna Gemini C6-fenilo, 100 × 4,6 mm, con 3 µm de tamaño de partícula (Phenomenex, USA). La fase móvil estuvo compuesta por 28% acetonitrilo / 72% agua con trietilamina al 0,4%, ajustado a pH 4 con ácido acético glacial. La elución se realizó a un caudal de 1 mL/min. El detector se fijó en longitudes de onda de excitación y emisión de 230 y 310 nm, respectivamente. Para la cuantificación, se construyó una curva de calibración de áreas de pico en función de la concentración de FLX, a partir de la inyección de soluciones patrón preparadas mediante el agregado de cantidades conocidas de FLX a agua control y procesadas de la misma manera que las muestras. Las concentraciones de FLX en las muestras fueron calculadas por interpolación sobre la curva de calibración ($R^2 = 0,99$), a partir del área del pico cromatográfico correspondiente a cada una de ellas. Para cada par de muestras de agua del acuario, se calculó la media y el desvío estándar, expresando la concentración de FLX como porcentaje de la concentración nominal (25 µg/L). Estas determinaciones se llevaron a cabo en la Gerencia de Química del Centro Atómico Constituyentes (Comisión Nacional de Energía Atómica), con la colaboración de la Dra. Paola Babay.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como media \pm error estándar y se analizaron mediante el programa R (R Core Team, 2023) a través del entorno RStudio (Posit Team, 2024). Los parámetros de agresión discretos (número de embestidas, número de persecuciones, número de peleas y números de agresiones totales) se analizaron mediante modelo lineal generalizado (GLM) con distribución binomial negativa y modelado de varianzas. La latencia se analizó mediante GLM con distribución gamma y modelado de varianzas. Los parámetros de agresión continuos (tiempo de persecuciones, tiempo de peleas, tiempo de agresiones y duración de la pelea más larga) se analizaron mediante ANOVA de una vía, y se empleó la prueba de Tukey para comparaciones múltiples a posteriori entre tratamientos. Los parámetros de locomoción correspondientes al tratamiento control en ambas especies se compararon mediante una prueba de t de Student. Para evaluar diferencias entre tratamientos en cada especie, los parámetros de locomoción se analizaron mediante ANOVA de una vía con modelado de varianzas cuando fue necesario. Para comparaciones múltiples a posteriori entre tratamientos se empleó la prueba de Tukey. Para evaluar las diferencias entre tratamientos en función del conjunto de variables de

agresión y de locomoción, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis multivariado PERMANOVA para cada grupo de variables, empleando el programa PAST v3.26 (Hammer et al., 2001). Con el fin de evaluar si los efectos observados resultaron dependientes de la concentración de FLX, se analizó la correlación entre los distintos parámetros y la concentración del fármaco mediante el coeficiente de Pearson. Los niveles endógenos de cortisol se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples de Tukey. Para todas las pruebas estadísticas, se estableció un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Resultados

Interacciones agresivas

C. decemmaculatus

En los ensayos con madrecitas, las interacciones agresivas constatadas correspondieron, en casi todos los casos, a los registros postalimentación, involucrando al menos a cuatro de los cinco individuos de cada acuario. La única excepción se dio en el ensayo E1, en el que se observaron algunas interacciones agresivas en el tratamiento FLX 25 antes de la alimentación. Dichas interacciones correspondieron mayoritariamente a embestidas e involucraron solo a tres de los cinco individuos.

El tiempo de latencia hasta la manifestación de la primera interacción agresiva fue muy variable entre tratamientos y entre ensayos. El mínimo valor registrado fue de 8 seg para el tratamiento FLX 25 del ensayo E1 mientras que el valor más alto fue de 240 seg en el tratamiento control del ensayo E6. En conjunto, se observó una tendencia a la disminución de este parámetro con el aumento de la concentración de FLX, resultando significativa la diferencia entre los tratamientos control y FLX 5 ($p=0,0168$) pero no para el resto de las comparaciones de a pares entre tratamientos ($0,4361 < p < 0,9398$) (Figura 10).

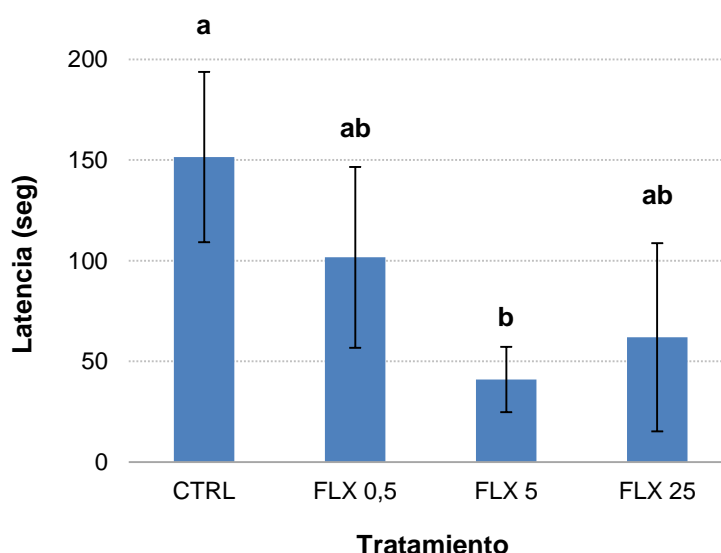


Figura 10. Efecto de la exposición a FLX sobre la latencia hasta la manifestación de la primera interacción agresiva entre coespecíficos de *C. decemmaculatus* luego de la alimentación. Letras distintas indican diferencias significativas.

En la Figura 11 se representa la cantidad total de embestidas realizadas por los ejemplares de *C. decemmaculatus* en cada tratamiento. Se observó una tendencia al incremento del

número de embestidas con la concentración de FLX, si bien las diferencias entre tratamientos no resultaron significativas ($p=0,078$).

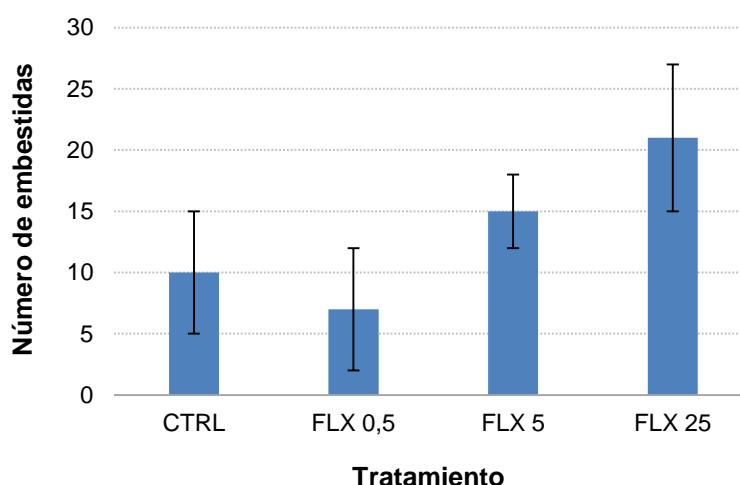


Figura 11. Efecto de la exposición a FLX sobre la cantidad total de embestidas entre coespecíficos de *C. decemmaculatus* luego de la alimentación.

En la Figura 12 se representan la cantidad y la duración total de las persecuciones registradas en cada tratamiento. Si bien el número medio de persecuciones fue mayor en los tratamientos FLX 5 y FLX 25, no se registraron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,078$)(Figura 12A). En relación a la duración de las persecuciones, se evidenció una tendencia al aumento de este parámetro con la concentración de FLX, con una diferencia significativa entre en el tratamiento FLX 25 y el control ($p=0,0262$) pero sin diferencias para el resto de las comparaciones de a pares entre tratamientos ($0,1224 < p < 0,8270$)(Figura 12B).

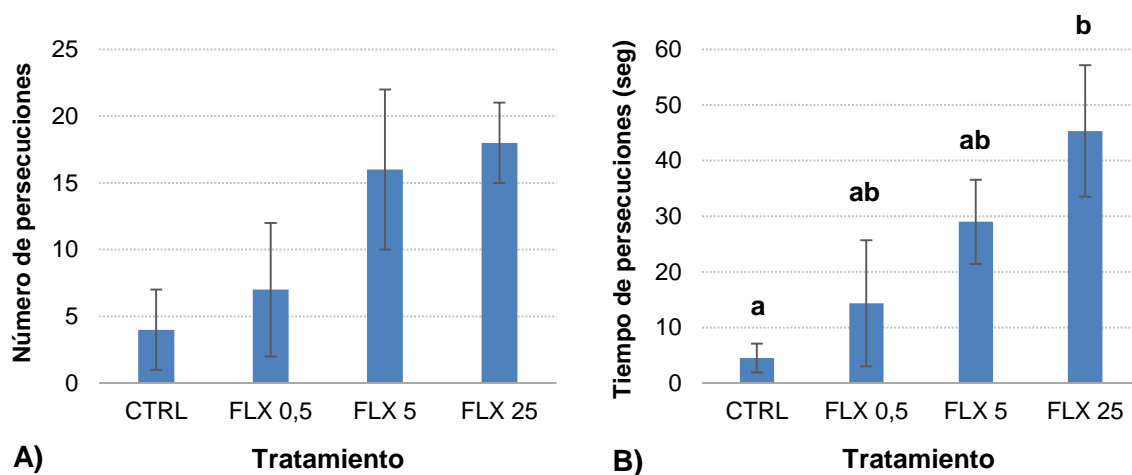


Figura 12. Efecto de la exposición a FLX sobre la cantidad (A) y duración total (B) de las persecuciones entre coespecíficos de *C. decemmaculatus* luego de la alimentación. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

En cuanto a las peleas registradas entre coespecíficos, el número y la duración total de las mismas resultó significativamente mayor en el tratamiento con la mayor concentración de FLX que en los restantes tratamientos ($0,0001 < p < 0,0475$ y $0,0010 < p < 0,0037$, respectivamente), los cuales no difirieron entre sí ($0,3534 < p < 0,9802$ y $0,8353 < p < 0,9965$, respectivamente) (Figura 13A, B). Por su parte, la duración de la pelea más larga mostró una tendencia al aumento con la concentración de FLX, resultando significativamente mayor en el tratamiento FLX 25 que en el control ($p = 0,0320$) pero sin diferencias significativas para el resto de las comparaciones de a pares entre tratamientos ($0,3822 < p < 0,8490$) (Figura 13C).

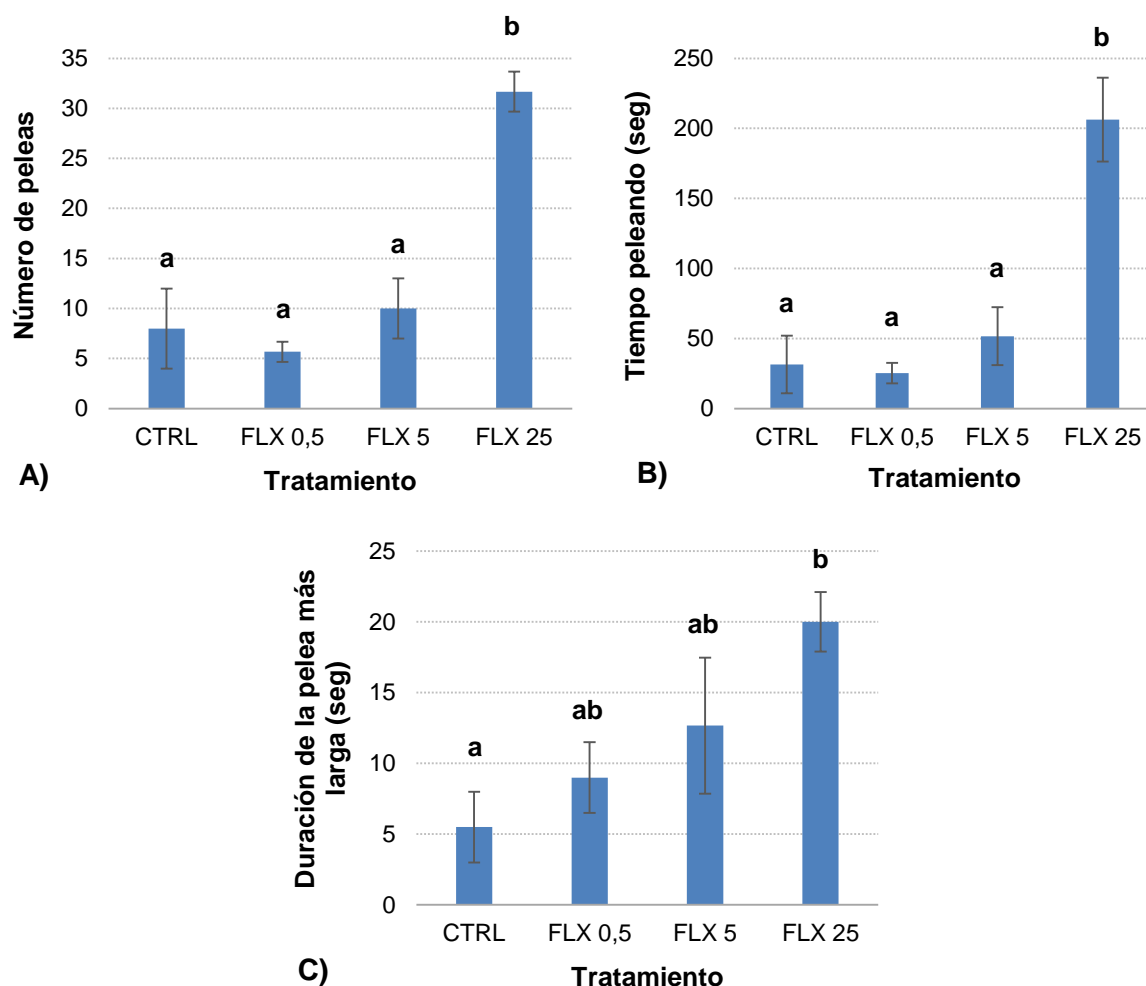


Figura 13. Efecto de la exposición a FLX sobre la cantidad (A) y la duración total (B) de las peleas, y la duración de la pelea más larga (C) entre coespecíficos de *C. decemmaculatus* luego de la alimentación. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

En la Figura 14 se representan de forma unificada las distintas formas de agresión registradas entre ejemplares de *C. decemmaculatus*. Al cuantificar conjuntamente los parámetros, se observó una tendencia generalizada al incremento tanto de la cantidad como de la duración total de las interacciones agresivas conforme aumentó la concentración de FLX. Para el número de agresiones, se registraron diferencias significativas entre el tratamiento FLX 25 y los tratamientos control ($p=0,0432$) y FLX 0,5 ($p=0,0247$), pero no con el tratamiento FLX 5 ($p=0,1216$). El resto de las comparaciones entre tratamientos resultaron no significativas ($0,4236 < p < 0,9994$) (Figura 14A). En el caso de la duración total de las interacciones agresivas, se comprobaron diferencias significativas entre FLX 25 y el resto de los tratamientos ($p=0,0001$, $p=0,0002$ y $p=0,0012$, respectivamente), los cuales no difirieron estadísticamente entre sí ($0,4122 < p < 0,9991$) (Figura 14B).

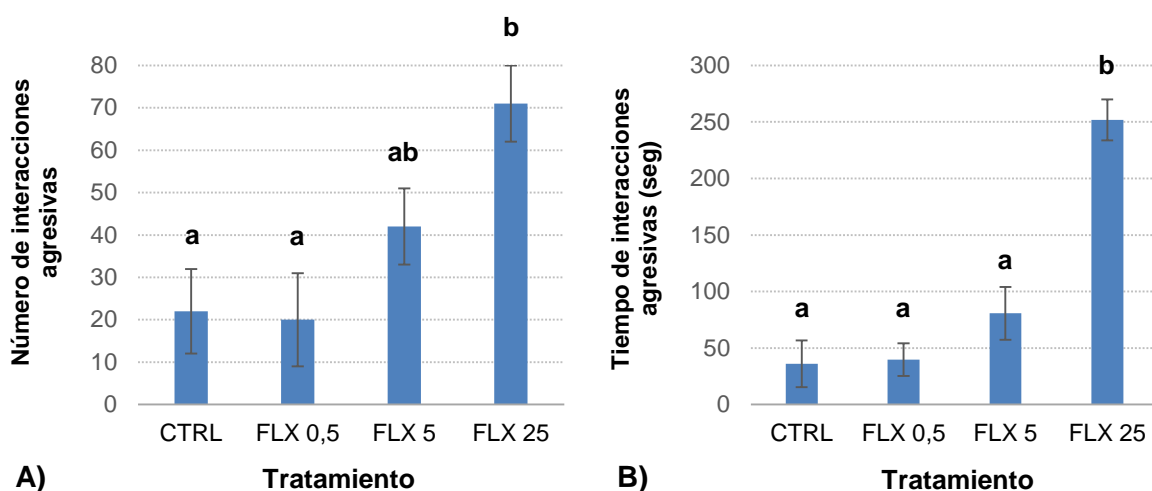


Figura 14. Efecto de la exposición a FLX sobre la cantidad (A) y la duración total (B) del conjunto de interacciones agresivas entre coespecíficos de *C. decemmaculatus* luego de la alimentación. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

El análisis de componentes principales en base a los parámetros de agresión en *C. decemmaculatus* mostró una clara separación del tratamiento FLX 25 con respecto a los restantes tratamientos. Los tratamientos control y FLX 0,5 mostraron un alto grado de solapamiento, mientras que el tratamiento FLX 5 mostró una tendencia a la separación de estos últimos, con un mínimo solapamiento con FLX 0,5. El componente 1 del análisis explicó el 67,13% de las diferencias totales. La contribución de los siete parámetros de agresión sobre este componente fue semejante, siendo el número de peleas el parámetro de mayor peso ($PC_1=0,4053$) y la duración de la pelea más larga el de menor peso ($PC_1=0,3481$). Por su parte, el componente 2 del análisis explicó el 19,24% de las diferencias totales. La contribución de los parámetros sobre este componente fue dispar, siendo el tiempo total de peleas el parámetro de mayor peso ($PC_2=0,4792$) y el número de embestidas el de menor peso ($PC_2=-0,1861$)(Figura 15).

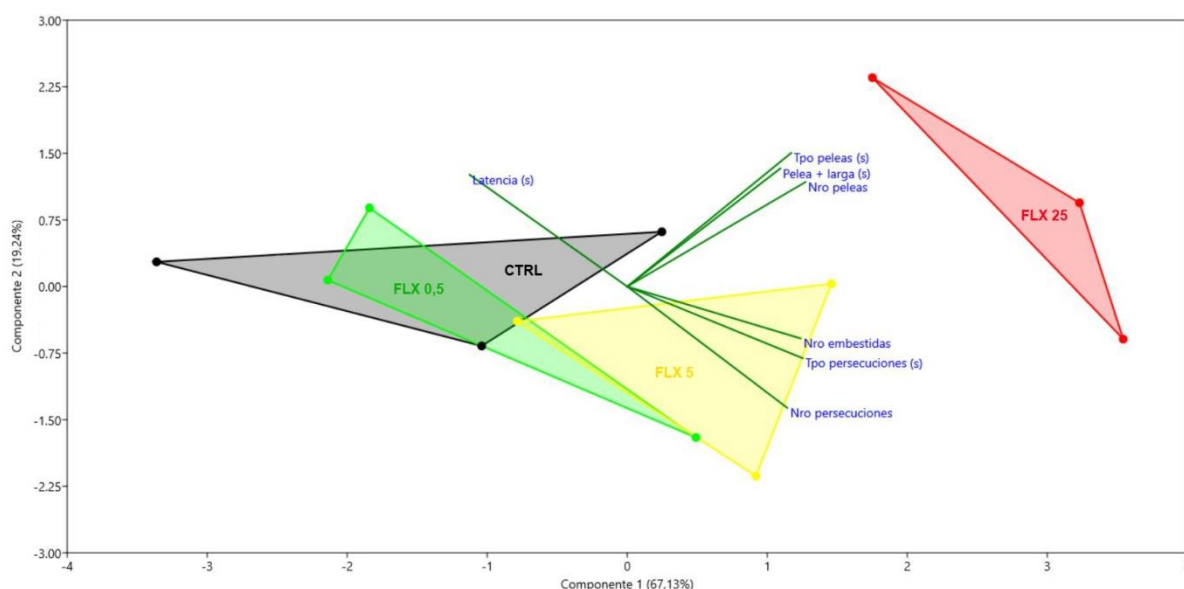


Figura 15. Diagrama del análisis de componentes principales en base a los parámetros de agresión entre coespecíficos de *C. decemmaculatus*.

El análisis multivariado Permanova efectuado sobre el conjunto de los parámetros de agresión mostró diferencias significativas del tratamiento FLX 25 con respecto al control ($p=0,0304$) mientras que no se registraron diferencias para el resto de las comparaciones de a pares entre tratamientos ($0,0998 < p < 0,5730$).

En la Tabla 2 se muestran las correlaciones entre los distintos parámetros de agresión cuantificados y la concentración de FLX. Se registraron correlaciones significativas para muchos de los parámetros, con excepción del número de embestidas y de persecuciones, y el tiempo de latencia. Los mayores valores del coeficiente de correlación se registraron para el número y la duración total de las peleas, y la duración total de las agresiones en conjunto.

Tabla 2. Correlaciones entre los parámetros de agresión y la concentración de FLX en *C. decemmaculatus*. Valores positivos o negativos del coeficiente de Pearson indican una relación lineal positiva o negativa entre el parámetro y la concentración de FLX, respectivamente. NS: correlación no significativa; S: correlación significativa.

Parámetro	Coeficiente de Pearson	p	Significancia
Latencia	-0,3221	0,283180	NS
Número de embestidas	0,5315	0,061608	NS
Número de persecuciones	0,5236	0,066303	NS
Duración total de las persecuciones	0,7113	0,006409	S
Número de peleas	0,8920	0,000042	S
Duración total de las peleas	0,9117	0,000014	S
Duración de la pelea más larga	0,7198	0,005535	S
Número de agresiones	0,7780	0,001739	S
Duración total de las agresiones	0,9450	0,00000113	S

G. holbrooki

En los ensayos con peces mosquito, no se registraron interacciones agresivas entre coespecíficos en casi ninguno de los tratamientos. Solo se detectaron despliegues de agresión en el tratamiento FLX 25 en dos de los tres ensayos realizados y únicamente en presencia de alimento. Los valores registrados para los distintos parámetros de agresión se presentan en la Tabla 3. En los individuos que intervinieron en las interacciones agresivas se observó un oscurecimiento instantáneo de la zona central y los bordes de las aletas dorsal, caudal y anal (Figura 16).

Tabla 3. Parámetros de interacciones agresivas en *G. holbrooki*, registrados en el tratamiento FLX 25 de dos de los tres ensayos, luego de la alimentación.

Ensayo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
E2	182	10	14	33	8	53	18	32	86	3
E5	163	8	4	10	4	73	55	16	83	4

A: latencia hasta la primera agresión (seg); B: número de embestidas; C: número de persecuciones; D: tiempo total de persecuciones (seg); E: número de peleas; F: tiempo total de peleas (seg); G: duración de la pelea más larga (seg); H: número de interacciones agresivas; I: tiempo total de interacciones agresivas (seg); J: número de peces involucrados.



Figura 16. Ejemplares de *G. holbrooki* del tratamiento FLX 25 mostrando el oscurecimiento de sus aletas asociado al despliegue de las interacciones agresivas. Barra=1 cm.

Actividad natatoria

La comparación entre los tratamientos control de ambas especies mostró diferencias significativas para algunos de los parámetros de locomoción cuantificados. La velocidad media, la distancia recorrida y el tiempo transcurrido en el tercio superior del acuario resultaron mayores en *C. decemmaculatus* que en *G. holbrooki*, mientras que lo opuesto se registró para el tiempo transcurrido en el tercio inferior. Para *C. decemmaculatus*, el tiempo transcurrido en los tercios inferior y superior fue semejante, mientras que los ejemplares de *G. holbrooki* permanecieron una mayor proporción de tiempo en el tercio inferior. Por su parte, no se registraron diferencias significativas entre ambas especies para el tiempo transcurrido en el tercio medio, el tiempo en movimiento y el tiempo quieto (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de los parámetros de actividad natatoria entre individuos de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki* del tratamiento control. Los valores entre paréntesis corresponden a los tiempos expresados como porcentaje. NS: diferencia no significativa; S: diferencia significativa.

Parámetro	<i>C. decemmaculatus</i>	<i>G. holbrooki</i>	p	Significancia
Velocidad media (cm/seg)	4,80±0,35	3,50±0,19	0,0094	S
Distancia recorrida (cm)	2728,43±209,34	1923,47±110,24	0,0076	S
Tiempo en movimiento (seg)	527,49±11,19 (87,91%)	510,61±13,26 (85,10%)	0,3510	NS
Tiempo quieto (seg)	48,16±8,11 (8,03%)	52,59±11,96 (8,76%)	0,7573	NS
Tiempo en tercio inferior (seg)	216,04±23,39 (36,00%)	318,07±44,43 (53,01%)	0,0413	S
Tiempo en tercio medio (seg)	124,57±12,53 (20,76%)	152,85±24,05 (25,47%)	0,2772	NS
Tiempo en tercio superior (seg)	240,20±22,22 (40,03%)	98,92±29,32 (16,49%)	0,0009	S

En la Figura 17 se representa la velocidad media de natación de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki* en los distintos tratamientos. Para ambas especies, se registró una tendencia a la disminución de este parámetro con el aumento de la concentración de FLX. En *C. decemmaculatus*, la velocidad media fue significativamente menor en el tratamiento FLX 25 que en los tratamientos control ($p=0,0008$) y FLX 0,5 ($p=0,0035$), pero no resultó estadísticamente diferente de la registrada en FLX 5 ($p=0,4029$). A su vez, la velocidad media registrada en FLX 5 fue inferior que en el control y FLX 0,5, si bien las diferencias no resultaron significativas ($p=0,0732$ y $p=0,1649$, respectivamente). Los tratamientos control y FLX 0,5 presentaron valores semejantes para este parámetro, que no difirieron entre sí ($p=0,9959$)(Figura 17A). En *G. holbrooki*, la velocidad media resultó menor en FLX 25 que en los restantes tratamientos ($p= 0,0006$; $p=0,0004$ y $p= 0,0190$, respectivamente), los cuales no difirieron significativamente entre sí ($0,5364 < p < 0,9998$)(Figura 17B).

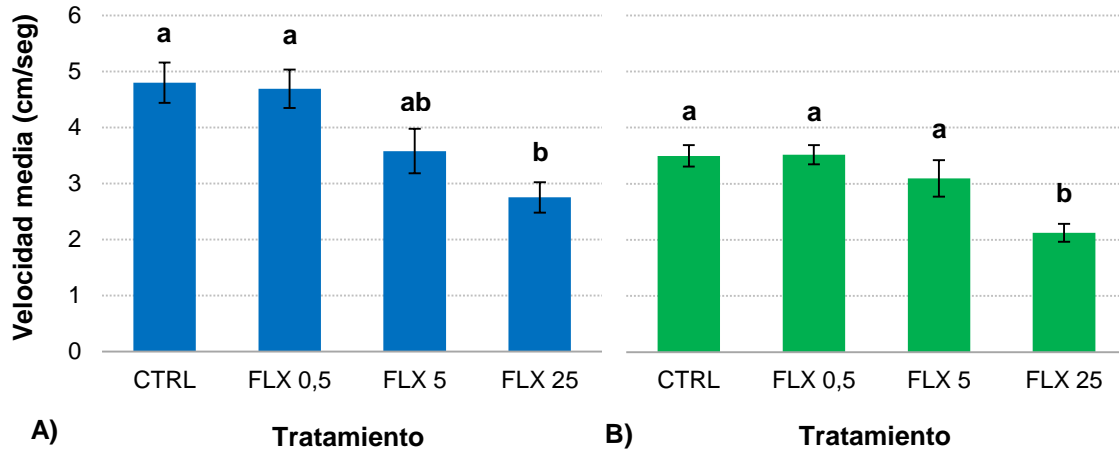


Figura 17. Efecto de la exposición a FLX sobre la velocidad de natación en *C. decemmaculatus* (A) y *G. holbrooki* (B). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada especie.

En la Figura 18 se representa la distancia recorrida por los ejemplares de ambas especies en los distintos tratamientos. Al igual que para la velocidad media, se observó una tendencia a la disminución de la distancia recorrida con el aumento de la concentración de FLX. En *C. decemmaculatus*, este parámetro resultó significativamente menor en el tratamiento FLX 25 que en los tratamientos control ($p=0,0007$) y FLX 0,5 ($p=0,0036$), pero no difirió estadísticamente del valor registrado en FLX 5 ($p=0,4085$). A su vez, la distancia recorrida en el tratamiento FLX 5 fue inferior que en el control y FLX 0,5, si bien las diferencias no resultaron significativas ($p=0,0698$ y $p=0,1623$, respectivamente). Los tratamientos control y FLX 0,5 presentaron valores semejantes para este parámetro, que no difirieron entre sí ($p=0,9952$) (Figura 18A). En *G. holbrooki*, la distancia recorrida resultó menor en FLX 25 que en los restantes tratamientos ($p=0,0013$; $p=0,0009$ y $p=0,0154$, respectivamente), los cuales no difirieron significativamente entre sí ($0,7338 < p < 0,9991$) (Figura 18B).

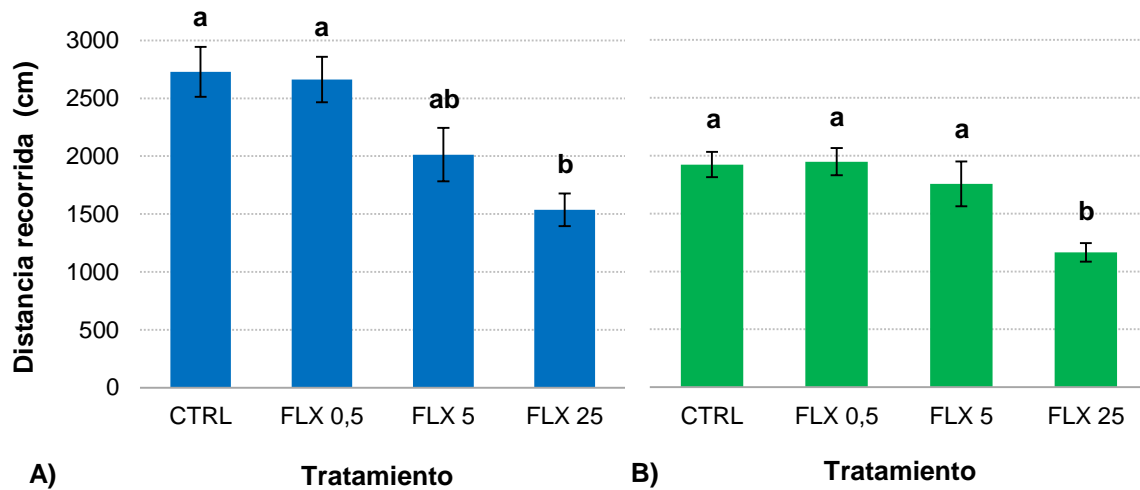


Figura 18. Efecto de la exposición a FLX sobre la distancia recorrida en *C. decemmaculatus* (A) y *G. holbrooki* (B). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada especie.

La Figura 19 muestra el tiempo que los ejemplares de cada especie estuvieron en movimiento o permanecieron estáticos en cada tratamiento. En ambas especies, el tiempo en movimiento fue mayor que el tiempo quieto en todos los tratamientos. En *C. decemmaculatus*, se observó una tendencia a la disminución del tiempo en movimiento y, por consiguiente, al aumento del tiempo quieto con el incremento de la concentración de FLX. El tratamiento FLX 25 mostró diferencias significativas con el control ($p=0,0228$ y $p=0,0068$, respectivamente) pero no con los otros dos tratamientos ($0,0807 < p < 0,9421$). A su vez, los ejemplares de FLX 5 estuvieron menos tiempo en movimiento y más tiempo quietos que los del control y FLX 0,5, si bien las diferencias entre estos tres tratamientos no resultaron significativas ($0,0626 < p < 0,3620$) (Figura 19A). En *G. holbrooki*, los ejemplares del tratamiento FLX 25 permanecieron menos tiempo en movimiento y más tiempo quietos que en los restantes tratamientos ($0,008 < p < 0,0149$ y $0,0016 < p < 0,0367$, respectivamente), los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí para estos parámetros ($0,8867 < p < 0,9992$) (Figura 19B).

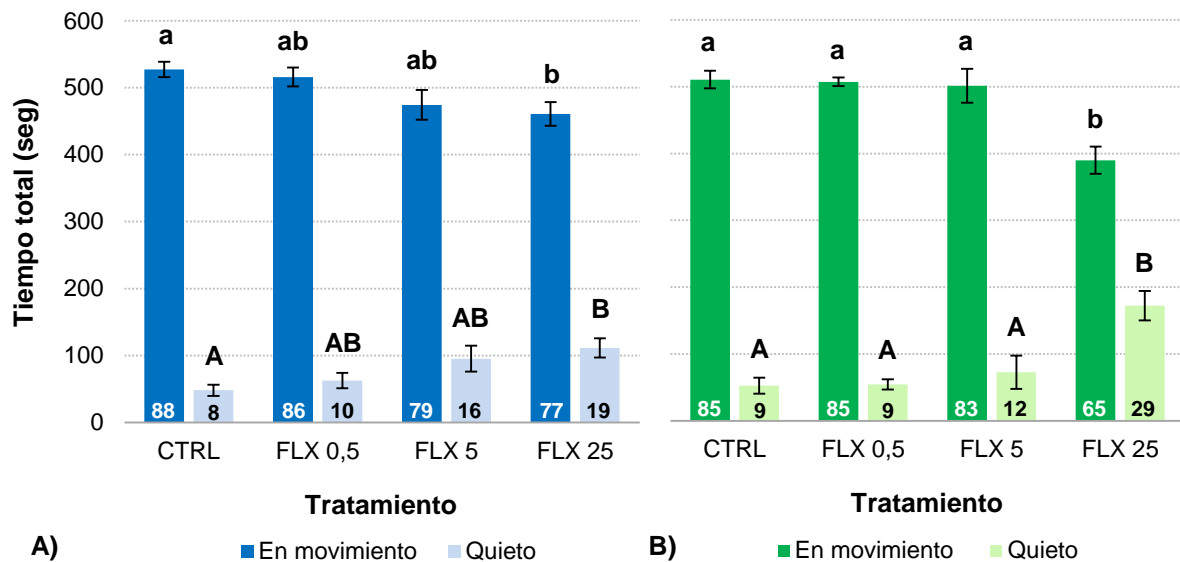


Figura 19. Efecto de la exposición a FLX sobre el tiempo transcurrido en movimiento o estático en *C. decemmaculatus* (A) y *G. holbrooki* (B). Los valores indicados sobre las barras corresponden a los tiempos expresados como porcentaje. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para el tiempo en movimiento, en cada especie. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para el tiempo quieto, en cada especie.

En la Figura 20 se representa el tiempo que los ejemplares de cada especie permanecieron en el tercio inferior y en el tercio superior de la columna de agua en cada tratamiento. En *C. decemmaculatus*, se registraron tiempos relativamente similares en ambos tercios en los tratamientos control, FLX 0,5 y FLX 5, los cuales no mostraron diferencias entre sí ($0,3899 < p < 0,9608$). En el tratamiento con la mayor concentración de FLX, se observó una disminución del tiempo transcurrido en el tercio inferior, registrándose diferencias significativas con el control ($p=0,0008$) y FLX 5 ($p=0,0253$) pero no con FLX 0,5 ($p=0,1178$). A su vez, se registró un incremento del tiempo transcurrido en el tercio superior, el cual resultó significativamente mayor que en los restantes tres tratamientos ($p=0,0006$, $p=0,0108$ y $p=0,0004$, respectivamente)(Figura 20A). En *G. holbrooki*, se observó una tendencia a la disminución del tiempo transcurrido en el tercio inferior y al concomitante aumento del tiempo transcurrido en el tercio superior conforme aumentó la concentración de FLX. Para ambos tiempos, se registraron diferencias significativas entre el tratamiento FLX 25 y los restantes tratamientos ($0,0058 < p < 0,0097$ y $0,0001 < p < 0,0002$, respectivamente), los cuales no mostraron diferencias entre sí ($0,4152 < p < 0,9948$)(Figura 20B). En esta especie, el tiempo transcurrido en el tercio inferior fue mayor que el tiempo transcurrido en el tercio superior en los tratamientos control, FLX 0,5 y FLX 5, mientras que esta situación se invirtió en el tratamiento con la mayor concentración de FLX.

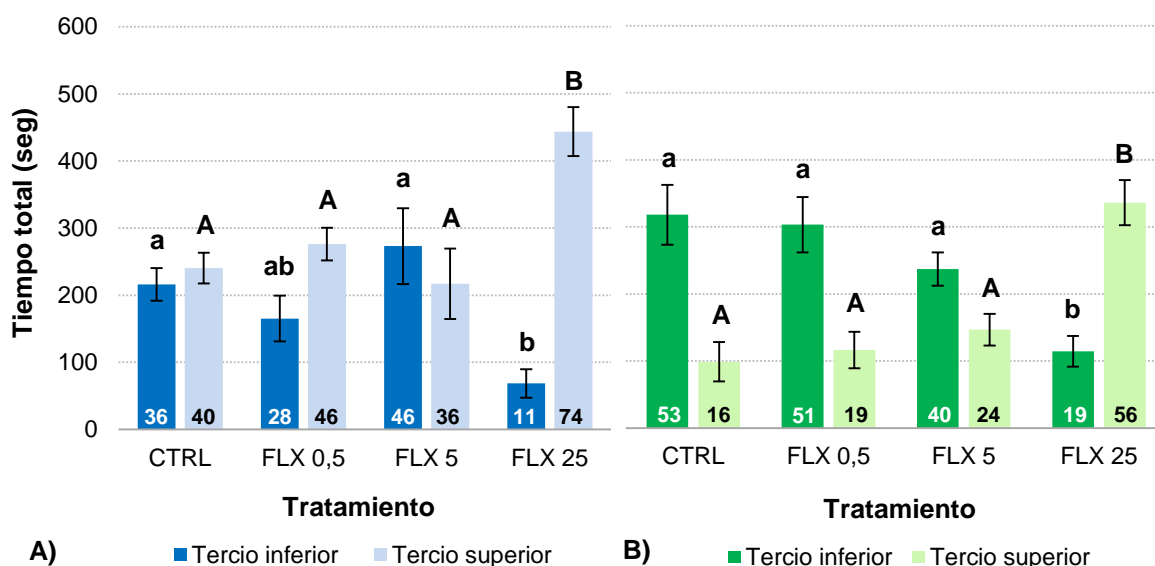


Figura 20. Efecto de la exposición a FLX sobre el tiempo transcurrido en el tercio inferior o superior de la columna de agua en *C. decemmaculatus* (A) y *G. holbrooki* (B). Los valores indicados sobre las barras corresponden a los tiempos expresados como porcentaje. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para el tiempo en el tercio inferior, en cada especie. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para el tiempo en el tercio superior, en cada especie.

El análisis de componentes principales en base a los parámetros de locomoción en *C. decemmaculatus* mostró una separación del tratamiento FLX 25 con respecto a los tratamientos control y FLX 0,5 y un solapamiento parcial con FLX 5. Los tratamientos control y FLX 0,5 mostraron una superposición casi completa, mientras que el tratamiento FLX 5 mostró un solapamiento parcial con los restantes tratamientos. El componente 1 del análisis explicó el 59,19% de las diferencias totales, con una contribución similar de los parámetros velocidad media ($PC_1=0,4834$), distancia recorrida ($PC_1=0,4902$), tiempo en movimiento ($PC_1=0,3986$) y tiempo quieto ($PC_1=0,4591$). Por su parte, el componente 2 explicó el 30,24% de las diferencias totales, con una contribución semejante de los parámetros tiempo en tercio inferior ($PC_2=-0,6984$) y tiempo en tercio superior ($PC_2=0,6614$) (Figura 21).

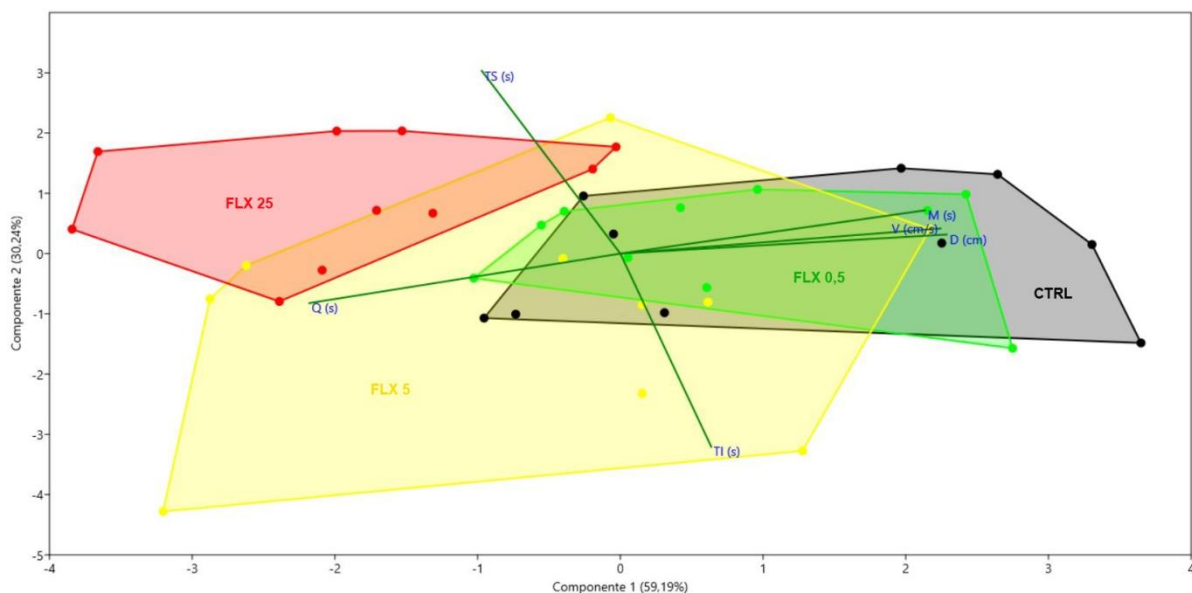


Figura 21. Diagrama del análisis de componentes principales en base a los parámetros de locomoción en *C. decemmaculatus*. D: distancia recorrida, M: tiempo en movimiento, Q: tiempo quieto, TI: tiempo en tercio inferior, TS: tiempo en tercio superior, V: velocidad media.

El análisis multivariado Permanova efectuado sobre el conjunto de los parámetros de locomoción mostró diferencias significativas del tratamiento FLX 25 con respecto al control ($p=0,0003$), FLX 0,5 ($P=0,0002$) y FLX 5 ($p=0,0488$). A su vez, el tratamiento FLX 5 se diferenció significativamente del control ($p=0,0364$) y de FLX 0,5 ($p=0,0435$), mientras que no se registraron diferencias entre el control y FLX 0,5 ($p=0,8154$).

Para *G. holbrooki*, el análisis de componentes principales en base a los parámetros de locomoción mostró una separación casi completa del tratamiento FLX 25 con respecto a los tratamientos control y FLX 0,5 y un leve solapamiento con FLX 5. Los tratamientos control y FLX 0,5 mostraron una superposición casi completa, mientras que el tratamiento FLX 5 mostró un solapamiento pronunciado con los tratamientos control y FLX 0,5. El componente 1 del análisis explicó el 72,82% de las diferencias totales. La contribución de los seis parámetros de locomoción sobre este componente fue relativamente similar, siendo la velocidad media el parámetro de mayor peso ($PC_1=0,4478$) y el tiempo en el tercio inferior el de menor peso ($PC_1=0,3145$). Por su parte, el componente 2 del análisis explicó el 18,52% de las diferencias totales, con una contribución principal del parámetro tiempo en tercio inferior ($PC_2=-0,6881$) y en menor medida de los parámetros tiempo en tercio superior ($PC_2=0,4828$), tiempo en movimiento ($PC_2=0,3585$) y tiempo quieto ($PC_2=-0,3714$) (Figura 22).

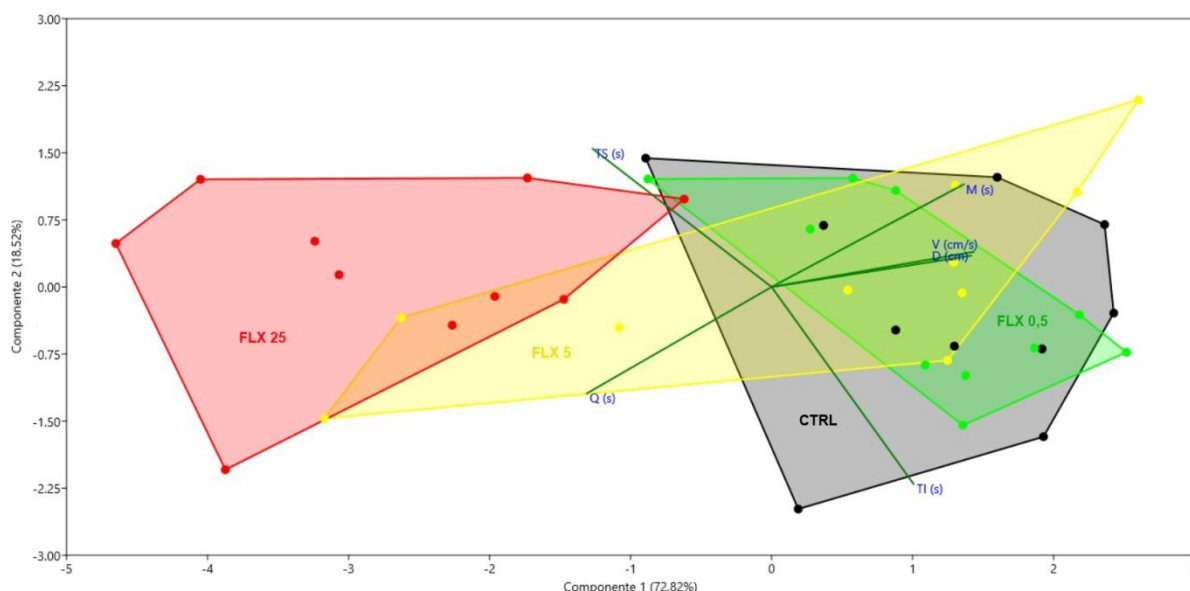


Figura 22. Diagrama del análisis de componentes principales en base a los parámetros de locomoción en *G. holbrooki*. D: distancia recorrida, M: tiempo en movimiento, TI: tiempo en tercio inferior, TS: tiempo en tercio superior, Q: tiempo quieto, V: velocidad media.

El análisis multivariado Permanova efectuado sobre el conjunto de los parámetros de locomoción mostró diferencias significativas del tratamiento FLX 25 con respecto al control ($p=0,0001$), FLX 0,5 ($p=0,0002$) y FLX 5 ($p=0,0043$), mientras que no se registraron diferencias para el resto de las comparaciones de a pares entre tratamientos ($0,3989 < p < 0,9633$).

En la Tabla 5 se muestran las correlaciones entre cada uno de los parámetros de actividad natatoria de *C. decemmaculatus* y la concentración de FLX. En todos los casos, las correlaciones fueron estadísticamente significativas. El p valor más significativo se halló para el parámetro tiempo en el tercio superior, el cual mostró una relación lineal positiva con la concentración de FLX, al igual que el tiempo quieto. Para los parámetros velocidad media, distancia recorrida, tiempo en movimiento y tiempo en el tercio inferior, se registró una relación lineal negativa con la concentración de FLX.

Tabla 5. Correlaciones entre los parámetros de actividad natatoria y la concentración de FLX en *C. decemmaculatus*. Valores positivos o negativos del coeficiente de Pearson indican una relación lineal positiva o negativa entre el parámetro y la concentración de FLX, respectivamente. S: correlación significativa.

Parámetro	Coeficiente de Pearson	p	Significancia
Velocidad media (cm)	-0,5522	0,0001017	S
Distancia recorrida (cm/seg)	-0,5523	0,0001014	S
Tiempo en movimiento (seg)	-0,4012	0,0069519	S
Tiempo quieto (seg)	0,4427	0,0026182	S
Tiempo en tercio inferior (seg)	-0,4212	0,0044129	S
Tiempo en tercio superior (seg)	0,5735	0,0000472	S

En la Tabla 6 se muestran las correlaciones entre cada uno de los parámetros de actividad natatoria de *G. holbrooki* y la concentración de FLX. En todos los casos, las correlaciones fueron estadísticamente significativas. El patrón de las relaciones encontradas se repitió respecto de lo hallado para *C. decemmaculatus*, siendo positivas para el tiempo quieto y el tiempo en el tercio superior, y negativas para la velocidad media, la distancia recorrida, el tiempo en movimiento y el tiempo en el tercio inferior. Sin embargo, los coeficientes mostraron valores absolutos más altos y valores p más bajos. El p valor más significativo se registró para el tiempo en el tercio superior, al igual que lo observado en *C. decemmaculatus*.

Tabla 6. Correlaciones entre los parámetros de actividad natatoria y la concentración de FLX en *G. holbrooki*. Valores positivos o negativos del coeficiente de Pearson indican una relación lineal positiva o negativa entre el parámetro y la concentración de FLX, respectivamente. S: correlación significativa.

Parámetro	Coeficiente de Pearson	p	Significancia
Velocidad media (cm)	-0,6430	0,0000077	S
Distancia recorrida (cm/seg)	-0,6242	0,0000167	S
Tiempo en movimiento (seg)	-0,6810	0,0000013	S
Tiempo quieto (seg)	0,6708	0,0000022	S
Tiempo en tercio inferior (seg)	-0,5989	0,0000446	S
Tiempo en tercio superior (seg)	0,7404	0,000000047	S

Niveles endógenos de cortisol

Al realizar las determinaciones sobre las muestras de los ensayos E1-E4, que habían sido conservadas en freezer a -80 °C, no se alcanzó el límite de detección de la técnica empleada en la mayoría de las lecturas. Por lo tanto, no fue posible obtener resultados a partir de dichas muestras. Por el contrario, las muestras correspondientes a los ensayos E5 y E6 fueron procesadas en el momento, lográndose determinar los niveles endógenos de cortisol mediante la técnica de ELISA. Para *C. decemmaculatus*, se registró una menor concentración media de cortisol en el control que en los tratamientos con FLX, siendo esta diferencia significativa únicamente con el tratamiento FLX 0,5 ($p=0,0254$). Para el resto de la comparaciones entre tratamientos, no se registraron diferencias significativas ($0,1110 < p < 0,9324$)(Figura 23A). Para *G. holbrooki*, no se registraron diferencias significativas entre los niveles de cortisol correspondientes a los distintos tratamientos ($p=0,6406$)(Figura 23B).

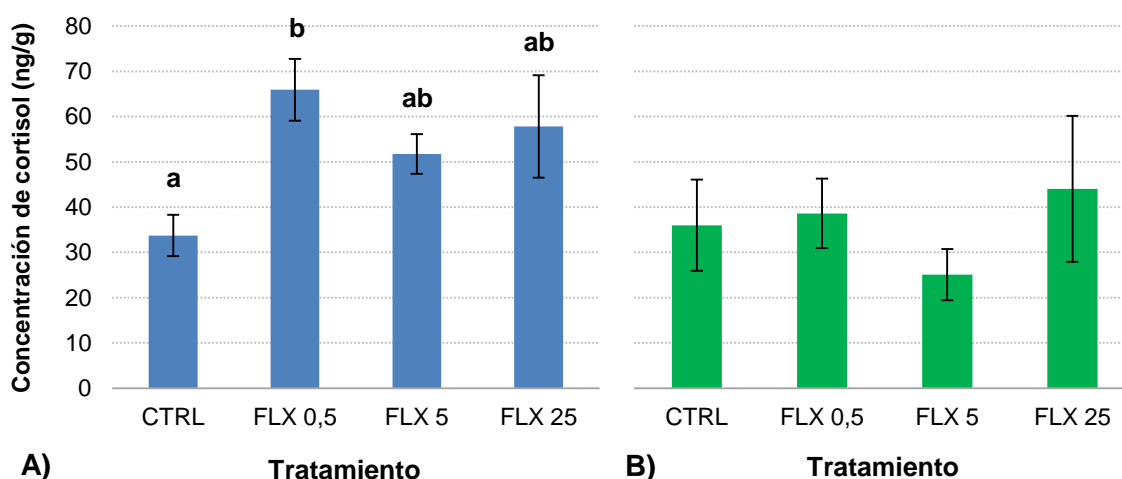


Figura 23. Efecto de la exposición a FLX sobre los niveles endógenos de cortisol en ejemplares de *C. decemmaculatus* (A) y *G. holbrooki* (B). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Verificación analítica de la concentración de FLX

En la Tabla 7 se indican las concentraciones de FLX determinadas en las muestras de agua tomadas a las 0 h y 24 h de un acuario conteniendo 25 µg/L de FLX. Al tiempo 0, la concentración medida de FLX fue 22,42 µg/L, lo que representa un 90% de la concentración nominal. A las 24 h, la concentración medida fue 19,94 µg/L, lo que representa un 79,50% de la concentración nominal, implicando una disminución del 10,5 % respecto de la concentración inicial. Por otro lado, no se detectó FLX en las muestras del acuario control.

Tabla 7. Concentraciones de FLX medidas en el agua de ensayo a las 0 h y 24 h después del agregado del fármaco (n=2 por acuario).

	Concentración nominal: 25 µg/L	
Tiempo (h)	Concentración medida (µg/L)	Concentración medida (%)
0	22,42 ± 0,32	90,00 ± 1,41
24	19,94 ± 0,26	79,50 ± 0,71

Discusión

En este trabajo de tesis se evaluaron los efectos de la exposición a un fármaco neuroactivo, el antidepresivo FLX, sobre el comportamiento de dos especies de poecílidos que comúnmente integran la ictiofauna en cuerpos de agua dulce del centro y norte de Argentina. *C. decemmaculatus* es una especie nativa que habita en ambientes lénticos, someros y vegetados con escasa corriente (Almirón et al, 1992). *G. holbrooki* es una especie exótica invasora que fue introducida a mediados del siglo pasado con el objetivo de controlar las poblaciones de mosquitos transmisores de enfermedades y desde entonces su área de distribución se ha ampliado, compartiendo en la actualidad el hábitat con *C. decemmaculatus* y otros cyprinodontiformes con características ecológicas semejantes (Cabrera et al., 2017). Ambas especies se caracterizan por adaptarse a condiciones ambientales variables y ser tolerantes a la contaminación. A su vez, son especies comúnmente empleadas como modelos experimentales en estudios ecotoxicológicos. Por dichos motivos, fueron seleccionadas en el presente trabajo de tesis para evaluar comparativamente el efecto de la exposición a FLX sobre el comportamiento agresivo y la actividad natatoria.

Condiciones experimentales de los ensayos

La menor concentración de ensayo seleccionada en este estudio (0,5 µg/L) es una concentración habitualmente reportada en los efluentes de aguas residuales y se corresponde con los niveles máximos de FLX registrados en cuerpos de agua de distintas regiones geográficas (Brooks et al., 2005; Mole y Brooks, 2019; Gould et al., 2021; Salahinejad et al., 2022). A su vez, se encuentra dentro del rango de los niveles combinados de ISRS reportados en el ambiente acuático, que pueden variar entre 0,4 y 3,2 µg/L (Metcalf et al. 2010), por lo que fue considerada una concentración de relevancia ambiental. Por su parte, la mayor concentración de ensayo (25 µg/L) fue seleccionada como control positivo ya que según el modelo de “plasma de peces” (Huggett et al., 2003, modificado por Margiotta-Casaluci et al., 2014), refleja una concentración nominal necesaria para alcanzar los niveles plasmáticos terapéuticos observados en pacientes humanos. Según este modelo, una exposición a 25 µg/L de FLX daría lugar a una concentración plasmática de 94 µg/L, la cual queda comprendida dentro del rango terapéutico en humanos, siendo este de 91-302 µg/L (Margiotta-Casaluci et al., 2014). Esta elección se fundamenta además en la hipótesis de extrapolación (Rand-Weaver et al., 2013), la cual establece una similitud en el modo de acción de los fármacos en humanos y en el resto de los vertebrados, al compartir los blancos moleculares, evinciándose efectos farmacológicos

a concentraciones plasmáticas similares. A su vez, en un estudio previo ya se había comprobado un efecto de atenuación de la actividad natatoria en hembras de *G. holbrooki* al ser expuestas a 25 µg/L de FLX (Meijide et al., 2018). Por otro lado, la máxima concentración empleada en este trabajo fue al menos un orden de magnitud menor que los valores de concentración letal 50 (CL₅₀) informados para peces teleósteos (Brooks et al., 2003) incluyendo neonatos del pez mosquito (CL₅₀=546 µg/L; Henry y Balck, 2008).

El diseño de exposición empleado en este estudio fue de tipo semiestático con renovación diaria de las soluciones de ensayo. Las mediciones realizadas en el agua de un acuario con concentración de 25 µg/L de FLX indicaron que la concentración real del fármaco fue del 90% de la concentración nominal al tiempo 0 y disminuyó un 10% al cabo de 24 h. Por lo tanto, es posible asumir que los peces estuvieron expuestos a concentraciones relativamente estables de FLX durante los ensayos realizados. Este descenso en el lapso de 24 h es similar al informado por Pan et al. (2018) y es acorde a la estabilidad en solución acuosa reportada para este fármaco (Kwon y Armbrust, 2006).

Los recambios de las soluciones de ensayo fueron realizados en un mismo horario del día. A su vez cada tratamiento fue iniciado y concluido en un día distinto de modo de garantizar que los registros y la toma de muestras se realizaran en una franja horaria acotada y similar para cada tratamiento, evitando de este modo un posible efecto de variación circadiana de los parámetros analizados (Melvin, 2017).

En cada ensayo se realizó una única réplica por tratamiento ya que no fue posible contar con una cantidad de ejemplares de tamaño uniforme suficiente como para incrementar el número de réplicas. Por lo tanto, los ensayos fueron repetidos, empleando ejemplares provenientes de los mismos sitios de colecta, y se consideraron los registros de cada ensayo como réplicas. En cada uno de los ensayos, los peces se distribuyeron al azar en los tratamientos, lográndose una homogeneidad de tamaño de los organismos. Sin embargo, para ambas especies existió cierta variación del tamaño medio de los ejemplares entre ensayos.

En los ensayos se emplearon únicamente hembras de modo de evitar el acoso sexual y los intentos de cópula por parte de los machos, lo cual podría haber tenido influencia en la dinámica de las interacciones agresivas. En cuanto a la extracción de cortisol, el uso de hembras solamente tuvo el objetivo de evitar posibles variaciones intersexuales en los niveles endógenos de este esteroide y maximizar su extracción al ser las hembras de mayor tamaño.

Al momento de hacer los registros individuales de actividad natatoria, los peces permanecieron en los respectivos acuarios de registro durante 90 min, antes de efectuar las videograbaciones. Este período prolongado de habituación al nuevo entorno fue establecido de modo de obtener resultados más representativos de los parámetros de locomoción (Meijide et al., 2018) ya que los peces pueden responder a entornos novedosos con conductas tales como el “freezing”, sin expresar su comportamiento natatorio habitual. En este sentido, se ha reportado que las hembras de *G. holbrooki* son menos activas en sus desplazamientos inmediatamente después de ser transferidas al acuario de registro que luego de un período prolongado de habituación, sugiriendo que la “familiarización” con el ambiente influye en los parámetros locomotores (Meijide et al., 2018).

Efectos de la FLX sobre el comportamiento agresivo y la actividad natatoria

El comportamiento se configura como una herramienta emergente, con importancia creciente en la evaluación de los efectos adversos de los contaminantes sobre la salud y la vitalidad de los ecosistemas (Ford et al., 2021; Correia et al., 2023). Los parámetros comportamentales sirven como indicadores claves de la respuesta de las especies a las modificaciones ambientales, mostrando especial sensibilidad para monitorear los efectos de compuestos neuroactivos. La observación de estos patrones puede proporcionar información valiosa sobre la adaptabilidad y la resiliencia de las poblaciones en un entorno variable (Melvin y Wilson, 2013).

En primera instancia, en este estudio se evaluaron los efectos de la exposición a FLX sobre el comportamiento agresivo de ambas especies de poecílidos. En el caso de *C. decemmaculatus*, no se registraron conductas agresivas en ausencia de alimento en ninguno de los tratamientos, a excepción del tratamiento FLX 25 de uno de los ensayos, en el que se observaron escasos despliegues de agresión. Por el contrario, cuando los peces fueron alimentados, se evidenciaron interacciones agresivas en todos los tratamientos, incluyendo el control. En los tratamientos FLX 5 y FLX 25, todos los individuos participaron de alguna interacción agresiva y éstas resultaron mayores en número y duración. Asimismo, se observó que el tiempo de latencia disminuyó en estos dos tratamientos respecto de los tratamientos control y FLX 0,5. Debido a la alta variabilidad de los datos entre ensayos, el único tratamiento que mostró diferencias significativas con el control fue el correspondiente a la mayor concentración de FLX, para la mayor parte de los parámetros analizados. Si bien el valor medio registrado en el tratamiento FLX 5 resultó mayor que en el control, la diferencia no llegó a ser significativa. Esto se observa con claridad en la Figura 14, que muestra la cuantificación conjunta de las distintas interacciones agresivas registradas,

pudiendo considerarse dicha cuantificación como un “índice de agresividad” por tratamiento. Del mismo modo, el análisis multivariado sobre el conjunto de los parámetros de agresión mostró diferencias significativas únicamente entre los tratamientos control y FLX 25. Sin embargo, en el análisis de componentes principales, el tratamiento FLX 5 se separó claramente del control y mostró un mínimo solapamiento con FLX 0,5. Por lo tanto, es probable que la ausencia de significancia estadística para el tratamiento FLX 5 se deba al escaso número de réplicas empleado para el análisis del comportamiento agresivo. Posiblemente, un incremento del número de réplicas revelaría un efecto significativo para este tratamiento.

Por otro lado, las relaciones lineales positivas y estadísticamente significativas entre la mayoría de los parámetros de agresión y la concentración de FLX indican que las conductas agresivas se incrementaron al aumentar la concentración del fármaco. A partir del análisis conjunto de los resultados, es posible interpretar que el contexto de competencia por un recurso como el alimento promovió la aparición de ataques, persecuciones y enfrentamientos, y que su vez, la exposición a FLX tuvo un efecto concentración-dependiente sobre el desarrollo de las conductas agresivas entre coespecíficos.

En el caso de *G. holbrooki*, no se registraron interacciones agresivas de ningún tipo para los tratamientos control, FLX 0,5 y FLX 5, tanto en ausencia como en presencia de alimento, mientras que para el tratamiento FLX 25, se observaron despliegues de agresión únicamente cuando los peces fueron alimentados. Estos resultados parecerían indicar que las hembras de *G. holbrooki* no se involucran en comportamientos agresivos, pero que esta conducta puede ser inducida por concentraciones elevadas de FLX en un contexto de competencia por el alimento. Además, a nivel cualitativo, en el análisis de los registros fue posible identificar uno o dos individuos dominantes que concentraron la mayor cantidad de los despliegues de agresión. Asimismo, se evidenció un oscurecimiento instantáneo de las aletas de los ejemplares involucrados en las interacciones agresivas. Este hallazgo se relaciona con la asociación positiva entre la agresión y la intensidad de coloración observada en peces y otros grupos animales, dado que el sistema de melanocortina regula simultáneamente la coloración corporal y el comportamiento social (Dijkstra et al., 2017; Ruckman et al., 2024). En particular, Horth (2003) observó que el morfotipo melánico y el comportamiento agresivo son rasgos correlacionados en los machos de *G. holbrooki*. En el presente estudio, la manifestación de la agresividad estuvo asociada a un incremento instantáneo de la pigmentación de la zona central de las aletas de las hembras al momento de ser alimentadas, en el tratamiento con la mayor concentración de FLX. Esta observación es coherente con el rol de la serotonina en la regulación del comportamiento de los peces

(Winberg et al., 2001; Winberg y Nilsson, 1993; Winberg y Thornkvist, 2016) así como en la modulación de la pigmentación (Backstrom et al., 2015; Liu et al., 2020). Similarmente, se ha reportado que los guppies *Poecilia reticulata*, pertenecientes a la misma familia, pueden cambiar rápidamente el color de su iris de plateado a negro, aumentando la visibilidad de sus ojos, lo que se ha sugerido que actúa como una señal de agresión (Douglas Martin y Hengstebeck, 1981). Más recientemente, Ueda et al. (2024) comprobaron que los machos del medaka *Oryzias celebensis* con marcas oscuras sobre el cuerpo exhiben un mayor nivel de agresión hacia otros miembros de la misma especie. Por lo tanto, es probable que, en el presente estudio, el oscurecimiento de las aletas observado en las hembras agresivas funcione como señal social de dominancia en la competencia intraespecífica. En peces teleósteos, estos cambios rápidos de coloración a nivel de los melanóforos son controlados por neurotransmisores y neuromoduladores como la noradrenalina y la adenosina, lo que sugiere una participación del sistema nervioso periférico en su regulación (Kumazawa et al., 1984; Miyashita et al., 1984).

El análisis estadístico de los datos de agresión recabados en *G. holbrooki* resulta fútil, puesto que la variabilidad entre tratamientos fue prácticamente nula al no haberse registrado interacciones agresivas en la mayoría de ellos. Por lo tanto, esta ausencia de variabilidad entre los grupos hace que cualquier inferencia estadística carezca de sentido y relevancia. Sin embargo, al comparar cualitativamente los registros de agresión obtenidos para ambas especies, se evidencian ciertas diferencias que merecen ser destacadas. Por un lado, la ausencia de interacciones agresivas a bajas concentraciones de FLX en *G. holbrooki*, a diferencia de lo observado en *C. decemmaculatus*. A su vez, al contrastar los registros correspondientes al tratamiento FLX 25 de ambas especies, los valores de los parámetros calculados resultaron considerablemente inferiores en *G. holbrooki*. El promedio de la cantidad y la duración de los despliegues agresivos resultó menor, con diferencias de hasta un orden de magnitud. El tiempo de latencia registrado para *G. holbrooki* fue mayor (172,5 seg versus 62,3 seg para *C. decemmaculatus*) y en ninguno de los registros se observó a todos los individuos involucrados en interacciones agresivas, lo que sí sucedió en *C. decemmaculatus*. En conjunto, estos resultados sugieren un efecto más pronunciado de la FLX sobre la inducción del comportamiento agresivo en la especie nativa *C. decemmaculatus* que en la especie exótica *G. holbrooki*, aún cuando los niveles basales de agresividad en ambas especies son diferentes.

A partir de los resultados obtenidos, es posible concluir que, para las especies en estudio, el efecto de la FLX fue el de incrementar la agresividad entre coespecíficos en presencia de alimento, siendo este efecto más marcado y progresivo en *C. decemmaculatus* que en *G.*

holbrooki. Estos hallazgos avalan las hipótesis de trabajo 1 (la exposición a FLX modifica la dinámica de las interacciones agresivas en ambas especies, y este efecto es dependiente de la presencia de alimento), 4 (la respuesta es dependiente de la concentración de FLX) y 5 (el patrón de respuesta difiere entre ambas especies). Las hipótesis 1 y 4 son más claramente avaladas para *C. decemmaculatus* pero también resultan válidas para *G. holbrooki* al evidenciarse un efecto de la mayor concentración de FLX en esta especie.

Los comportamientos agresivos y defensivos se consideran una característica adaptativa esencial, ampliamente observada en peces, especialmente en aquellas especies que viven en grupos, como una manera de formar y mantener jerarquías sociales (Reebs, 2008). Por lo general, los peces exhiben comportamientos agresivos para obtener acceso a recursos ambientales, parejas y territorio, así como para proteger a su descendencia (Ward et al., 2006; Magnhagen et al., 2008; Theodoridi et al., 2017).

En diversos estudios realizados en peces teleósteos, se ha reportado una alteración del comportamiento agresivo como resultado de la exposición aguda o crónica a FLX. En la mayoría de las especies, se ha observado un efecto “sedativo” de este fármaco, produciendo una disminución de la agresividad entre coespecíficos, en las que generalmente el nivel de agresión se correlaciona negativamente con la concentración de FLX (Perreault et al., 2003; Dziewieczynski y Hebert, 2012; Kania et al., 2012; Kohlert et al., 2012; Barry, 2013; Forsatkar et al., 2014; Greaney et al., 2015; Ansai et al., 2016; Eisenreich et al., 2017; McCallum et al., 2017; Theodoridi et al., 2017). Sin embargo, en algunos estudios no se observaron efectos significativos de la FLX sobre la agresión (Sebire et al., 2015; Thoré et al., 2020). En contraposición, pocos estudios han reportado una exacerbación del comportamiento agresivo por exposición a FLX. En uno de ellos, se observó que los machos dominantes del pez sapo *Opsanus beta* mostraron un aumento de la agresividad territorial, al igual que un incremento de los niveles circulantes de serotonina, luego de recibir una inyección intraperitoneal de 10 o 25 µg/g FLX (McDonald et al., 2011). En otro estudio, la exposición de ejemplares de la mojarra *Brycon amazonicus* a 500 µg/L FLX durante 12 hs causó un aumento de la agresividad, evidenciado por un incremento del número de ataques hacia un intruso y una disminución de la latencia hasta el primer ataque (Wolkers et al., 2017). Finalmente, Weinberger y Klaper (2014) reportaron que la exposición de machos de fathead minnow *Pimephales promelas* a 100 µg/L FLX durante cuatro semanas causó un incremento de la agresión hacia las hembras, produciendo un aumento significativo de la mortalidad. En el presente estudio, se observó un efecto inductor de la agresividad entre hembras de poecílidos por exposición a 25 µg/L FLX durante dos semanas. En este tratamiento, los individuos parecían más “irritables” y propensos a

involucrarse en peleas. Es importante remarcar que, salvo dos excepciones (ensayo E1, tratamiento FLX 25, prealimentación y ensayo E3, tratamiento FLX 25, postalimentación), las interacciones agresivas se evidenciaron cuando los peces fueron alimentados. En este sentido, la influencia del alimento en la agresión competitiva es un efecto generalizado que ha sido reportado en distintas especies de teleósteos (Ward et al., 2006). Sin embargo, en *C. decemmaculatus*, la presencia de alimento indujo el comportamiento agresivo y a su vez la agresividad se incrementó en forma monotónica por exposición a FLX; mientras que en *G. holbrooki*, la agresividad fue inducida por altas concentraciones de FLX pero la mera presencia de alimento no tuvo un efecto promotor de la agresividad. Esta diferencia parece reflejar un mayor nivel de agresividad intraespecífica basal en *C. decemmaculatus* en comparación con *G. holbrooki*, al menos en las condiciones experimentales empleadas en este estudio.

En relación a los mecanismos implicados en las alteraciones del comportamiento agresivo causadas por la exposición a FLX, es sabido que este fármaco induce sus efectos modulando el contenido cerebral de 5-HT. A su vez, el sistema serotoninérgico está involucrado en la regulación del comportamiento social en vertebrados (Blanchard et al., 2001; Raleigh et al., 1991; Winberg y Nilsson, 1993; Winberg y Thornkvist, 2016), lo que señala una conexión directa entre el modo de acción de la FLX y las respuestas conductuales. En peces teleósteos, se ha reportado que a largo plazo, la activación del sistema serotoninérgico tiene un efecto inhibitor sobre el comportamiento agresivo, y que los niveles crónicamente elevados de 5-HT son característicos de individuos socialmente subordinados y poco agresivos (Winberg et al., 2001; Winberg y Nilsson, 1993; Winberg y Thornkvist, 2016). Por ende, es esperable que la exposición crónica a FLX tenga un efecto de atenuación de la agresividad, tal como se observó en la mayoría de las especies. Sin embargo, los efectos de una activación aguda de las vías serotoninérgicas son menos evidentes (Backstrom y Winberg, 2017). En este sentido, Winberg y Thornkvist (2016) reportaron que la exposición de ejemplares del pez cebra *Danio rerio* a 0,5 y 1,5 mg/L FLX durante 2 hs produjo una reducción significativa del contenido cerebral del metabolito de la serotonina 5-HIAA y de la relación entre ambos (5-HIAA/5-HT), lo cual indicó que el tratamiento empleado tuvo el efecto esperado de incremento de la actividad serotoninérgica cerebral; sin embargo no se observaron efectos sobre el comportamiento agresivo de machos ni hembras en interacciones diádicas del mismo sexo, ni en el resultado de las contiendas. Aparentemente, sólo la elevación a largo plazo de la actividad cerebral de 5-HT daría lugar a la inhibición del comportamiento agresivo que muestran los peces socialmente subordinados. Según estos autores, el incremento de la actividad serotoninérgica que se observa tanto en individuos ganadores como en perdedores durante la fase inicial de la

formación de jerarquías podría estar relacionado con un efecto de activación de la serotonina en respuesta a la interacción social, independientemente del resultado de la misma. En el presente estudio, es posible que el efecto inductor de la agresividad por exposición a FLX se deba a un efecto de tipo agudo a subcrónico sobre el sistema nervioso central, por lo que sería necesario complementar los resultados obtenidos con mediciones de los niveles cerebrales de 5-HT, 5-HIAA y la relación 5-HIAA/5-HT a fin de verificar si el régimen de exposición empleado causó alguna modificación del sistema serotoninérgico. Otro posible mecanismo de acción de la FLX es a través de la actividad de la 5-HT sobre las vías de señalización de otros neuropéptidos cerebrales involucrados en la regulación del comportamiento social como vasotocina e isotocina (Lindeyer et al., 2015). Por otro lado, no existe aún evidencia suficiente de que el cambio en los niveles cerebrales de serotonina inducidos por FLX y otros ISRS sea el único mecanismo responsable de las alteraciones comportamentales observadas en los peces (Salahinejad et al., 2022), dado que estos compuestos pueden también alterar la síntesis de 5-HT en áreas extracerebrales como el hígado, riñón y estómago, así como inhibir los transportadores de serotonina en células no neuronales, resultando en un incremento de los niveles circulantes de serotonina (McDonald, 2017). En definitiva, el conocimiento sobre los mecanismos que median los efectos conductuales de la 5-HT y de los compuestos moduladores como la FLX en peces teleósteos es aún limitado (Winberg y Thornkvist, 2016).

Posteriormente al análisis del comportamiento agresivo, se evaluó el efecto de la exposición a FLX sobre la actividad natatoria en individuos de ambas especies. En primera instancia, se evaluaron comparativamente los parámetros basales de locomoción en el tratamiento control, encontrándose diferencias significativas en muchos de ellos, exceptuando el tiempo en movimiento, el tiempo estático y el tiempo en el tercio medio. La velocidad media, la distancia recorrida y el tiempo en el tercio superior resultaron mayores en *C. decemmaculatus* que en *G. holbrooki*, mientras que lo opuesto se registró para el tiempo en el tercio inferior. Esto muestra que, bajo las condiciones experimentales empleadas, *C. decemmaculatus* es una especie más activa que *G. holbrooki* y frecuenta más el tercio superior de la columna de agua, mientras que *G. holbrooki* pasa más tiempo en el tercio inferior, cerca del fondo.

Al evaluar el efecto de la FLX, se observó en ambas especies una tendencia a la disminución de la velocidad media, la distancia recorrida y el tiempo en movimiento con el aumento de la concentración de FLX. En ambos casos, FLX 25 fue el único tratamiento que mostró diferencias significativas con el control. Sin embargo, en el caso de *C. decemmaculatus*, se observó un descenso más gradual de los parámetros. El valor medio

de los mismos en el tratamiento FLX 5 fue menor que en el control y FLX 0,5, y a su vez mayor que en FLX 25, si bien las diferencias no resultaron significativas. Sin embargo, el p valor de la comparación entre el control y FLX 5 tuvo valores marginales de 0,06-0,07, próximos a la significancia estadística. En *G. holbrooki*, el cambio de los parámetros fue más abrupto ya que FLX 25 mostró diferencias significativas con los otros tres tratamientos, los cuales presentaron valores medios semejantes que no difirieron entre sí. En esta especie, FLX 25 difirió significativamente de FLX 5, a diferencia de lo registrado en *C. decemmaculatus*.

A nivel del uso de la columna de agua, también se observaron diferencias significativas únicamente en el tratamiento FLX 25, con una tendencia al incremento del tiempo transcurrido en el tercio superior al aumentar la concentración de FLX, que resultó más nítida en *G. holbrooki*. En esta especie, se observó un incremento del tiempo en el tercio superior y una disminución del tiempo en el tercio inferior en forma progresiva conforme aumentó la concentración del fármaco, llegando invertirse la proporción de tiempo en ambos tercios en el tratamiento FLX 25. En *C. decemmaculatus*, los tiempos en ambos tercios fueron semejantes para los tratamientos control, FLX 0,5 y FLX 5, mientras que en la mayor concentración de FLX se registró un aumento significativo del tiempo en el tercio superior y una disminución en el tercio inferior.

En *C. decemmaculatus*, el análisis multivariado sobre el conjunto de los parámetros de locomoción mostró diferencias significativas con el control tanto para el tratamiento FLX 25 como para FLX 5. Es decir que, si bien no llegaron a registrarse efectos significativos del tratamiento FLX 5 en los análisis individuales de los parámetros (probablemente debido a un número insuficiente de réplicas), un análisis integratorio de todos los parámetros permitió evidenciar un efecto significativo para la concentración intermedia de FLX. A su vez, el análisis de componentes principales mostró una tendencia a la separación del tratamiento FLX 5 con respecto a los restantes tratamientos. En contraposición, el análisis multivariado en *G. holbrooki* confirmó un efecto significativo únicamente para el tratamiento FLX 25, a la vez que en el análisis de componentes principales se observó una mayor superposición del tratamiento FLX 5 con los tratamientos control y FLX 0,5, en comparación con *C. decemmaculatus*. En conjunto, estos resultados indican que la alteración de la actividad natatoria ocurre a una menor concentración de FLX en la especie nativa *C. decemmaculatus* que en la especie exótica *G. holbrooki*.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la correlación entre los parámetros de locomoción y la concentración de FLX resultó significativa en todos los casos, es posible interpretar que la

exposición a este fármaco tuvo un efecto concentración-dependiente de alteración de la actividad natatoria en ambas especies.

En base a los resultados obtenidos, es posible concluir que la FLX causó una atenuación de la actividad natatoria en ambas especies, lo que se tradujo en una menor velocidad media y distancia recorrida, y una reducción del movimiento en general, junto con una alteración en la distribución vertical, con una preferencia por la zona cercana a la superficie. A su vez, estos efectos mostraron un patrón de respuesta concentración-dependiente, ocurriendo en forma más gradual y a menores concentraciones de FLX en *C. decemmaculatus* que en *G. holbrooki*. Estos hallazgos apoyan las hipótesis de trabajo 2 (la exposición a FLX altera la actividad natatoria de ambas especies), 4 (la respuesta es dependiente de la concentración de FLX) y 5 (el patrón de respuesta difiere entre ambas especies).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo registrado en estudios previos, en los que también se observaron efectos de reducción de la actividad natatoria en larvas y adultos de peces expuestos a FLX (Kohlert et al., 2012; Winder et al., 2012; Barry, 2013; Duarte et al., 2019; Huang et al., 2019; Yamindago et al., 2021; Correia et al., 2022). Asimismo, en un estudio previo en el que se expusieron ejemplares de *G. holbrooki* a concentraciones de FLX similares a las empleadas en este trabajo (Meijide et al., 2018), se evidenció un patrón de respuesta similar al aquí reportado, confirmando la reproducibilidad de este efecto. El patrón concentración-dependiente observado en el presente trabajo es consistente con los estudios previamente mencionados al evidenciarse una correlación positiva entre la concentración de FLX y la atenuación de la actividad locomotora, con efectos significativos a concentraciones relativamente elevadas del fármaco. Sin embargo, ciertos autores han reportado respuestas no monotónicas de incremento de la actividad natatoria en peces expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de FLX (Martin et al., 2017; Al Shuraiqi et al., 2021). Este tipo de relaciones concentración-respuesta no monotónicas son inusuales pero dificultan la evaluación del riesgo potencial de alteración del comportamiento natatorio por exposición a FLX ya que impiden la generalización de efectos entre especies y entre distintos rangos de concentración del fármaco. Aún así, el conjunto de los hallazgos apoyan la hipótesis de que la exposición aguda o crónica a FLX puede alterar el comportamiento de natación de los peces teleósteos (Salahinejad et al., 2022).

Los mecanismos subyacentes a la alteración de la actividad natatoria inducida por FLX no son del todo conocidos; sin embargo es probable que, dado su modo de acción, estos cambios respondan a la modulación del sistema serotoninérgico. Es sabido que la 5-HT y

los receptores de 5-HT participan en la activación y modulación de las actividades locomotoras de los vertebrados (Schmidt y Jordan, 2000). Esto se debe a que las terminales de los axones 5-HT se encuentran distribuidos a lo largo la médula espinal, modulando el patrón de respuesta motora (Zhang y Grillner, 2000; Schmidt y Jordan, 2000). Por lo tanto, es posible la modificación de la actividad serotoninérgica a nivel de la médula espinal sea responsable de las alteraciones locomotoras inducidas por FLX. Por otro lado, se ha sugerido que la disminución de la actividad de natación puede estar relacionada con un efecto inhibitorio de la FLX sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, por lo que los vínculos entre las vías serotoninérgica y colinérgica y el comportamiento de los peces requieren ser explorados (Duarte et al., 2019).

El estudio de la actividad natatoria resulta de interés ya que la alteración de la locomoción puede tener un efecto directo sobre la supervivencia, el éxito reproductivo y los patrones de migración de los peces (Agerstrand et al., 2020; Salahinejad et al., 2022). Por ejemplo, los efectos hallados en este estudio, i.e. disminución de la actividad natatoria y tendencia a permanecer cerca de la superficie, podrían incrementar la vulnerabilidad de los individuos ante el ataque de un predador, siendo esto un elemento clave para la supervivencia de los organismos (Godin, 1997). En este sentido, distintos autores han reportado una disminución de la respuesta antipredatoria en peces expuestos a FLX (Painter et al., 2009; Weinberger y Klaper, 2014; Pelli y Connaughton, 2015; Martín et al., 2017). En consecuencia, sería interesante plantear nuevos experimentos que permitan evaluar los efectos subletales de este tipo de contaminantes sobre la respuesta locomotora, posibilitando algún nivel de extrapolación sobre la dinámica poblacional en la naturaleza. Por otro lado, los mecanismos subyacentes a las anomalías observadas en la respuesta de evasión aún no son del todo comprendidos. Estos podrían incluir la inhibición motora general o una disminución de la reacción ante estímulos externos (Eisenreich y Szalda-Petree, 2015). Por lo tanto, es necesario profundizar las investigaciones a fin de mejorar la comprensión de las vías y mecanismos involucrados en los efectos conductuales inducidos por la exposición a FLX.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que la exposición al fármaco antidepresivo FLX produjo un incremento del comportamiento agresivo y una alteración de la actividad natatoria de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki*. Para ambas especies, los efectos resultaron significativos a concentraciones superiores a las de relevancia ambiental. El factor de riesgo estimado para la FLX, calculado como el cociente entre la máxima concentración reportada en agua superficial a nivel global y la menor concentración de no-efecto reportada para peces teleósteos en la literatura, presenta un valor de 0,41, lo cual corresponde a un riesgo potencial bajo según la Agencia Europea de Medicamentos (Gould

et al., 2021). Sin embargo, cabe señalar que aunque las concentraciones ambientales de fármacos como la FLX sean inferiores a los umbrales que causan efectos adversos en el comportamiento, en el ambiente acuático es frecuente la presencia simultánea de diferentes compuestos con modos de acción compartidos y respuestas aditivas que podrían alterar el comportamiento en peces crónicamente expuestos a esta clase de contaminantes. En este sentido, se han reportado niveles combinados de ISRS que alcanzan los 3,2 µg/L (Metcalf et al. 2010), siendo este valor cercano a la concentración intermedia empleada en este estudio, i.e. 5 µg/L, que tuvo efectos significativos en *C. decemmaculatus*. A su vez, esto llevaría los niveles de exposición al rango de concentraciones para el cual se han reportado efectos fisiológicos y comportamentales en otras especies. Por lo tanto, resulta crucial efectuar ensayos de coexposición a fin de evaluar los posibles efectos aditivos de los fármacos antidepresivos comúnmente detectados en muestras ambientales.

Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos fue posible realizar un análisis comparativo de los efectos de la exposición a FLX sobre el comportamiento agresivo y la actividad natatoria en hembras de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki*. Para ambas especies, el tratamiento con 25 µg/L de FLX produjo una modificación significativa de los comportamientos analizados. Como se discutió anteriormente, esta concentración generaría concentraciones plasmáticas comprendidas dentro del rango terapéutico para humanos. A su vez, dicha concentración resulta dos órdenes de magnitud superior a las de relevancia ambiental. Sin embargo, en *C. decemmaculatus*, el análisis integral de los resultados indica que, a diferencia de *G. holbrooki*, el tratamiento con 5 µg/L de FLX causó una alteración significativa de la actividad natatoria. Asimismo, la agresividad intraespecífica fue mayor en los individuos expuestos a esta concentración de FLX que en el control, si bien el número de registros no fue suficiente como para revelar un efecto estadísticamente significativo. Aún cuando 5 µg/L sigue siendo una concentración superior a las reportadas en el ambiente acuático, estos resultados reflejan una mayor susceptibilidad de la especie nativa con respecto a la especie exótica ante la exposición a FLX. Estos hallazgos concuerdan con los de Bernal-Rey et al. (2017), quienes reportaron una mayor inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en *C. decemmaculatus* que en *G. holbrooki*, como resultado de la exposición al insecticida clorpirifós. Estas evidencias indican que si bien ambas especies son reconocidas por su resistencia a condiciones ambientales desfavorables, *G. holbrooki* sería más tolerante a la contaminación que *C. decemmaculatus*. Esto podría tener incidencia a nivel ecológico al implicar una ventaja adaptativa para la especie exótica en detrimento de la especie nativa, favoreciendo su capacidad invasora en contextos de estrés ambiental por presencia de contaminantes antropogénicos.

Efecto de la FLX sobre los niveles de cortisol

Los estudios fisiológicos son herramientas esenciales para evaluar el impacto de contaminantes emergentes en los organismos y ecosistemas acuáticos (Yuan et al., 2023). Tales rasgos están cobrando relevancia debido al cambio climático, ya que la exposición a contaminantes puede influir en la capacidad de los peces para tolerar y desempeñarse en un entorno cada vez más estresante (Monteiro et al., 2021). Existe evidencia de que la exposición crónica a los contaminantes genera una respuesta de adaptación, con un aumento crónico de los niveles de cortisol endógenos que, a su vez, impacta sobre la regulación de las respuestas de estrés (Rohonczy et al., 2021). Sin embargo, la respuesta de estrés y los niveles de cortisol pueden ser alterados de diferente manera según el modo de acción de los contaminantes y la duración de la exposición. Los ISRS pueden modular los niveles de cortisol ya que el sistema serotoninérgico está involucrado en su regulación, ya sea actuando directamente a nivel del tejido interrenal o indirectamente a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (Winberg et al., 1997; Kreke y Dietrich, 2008; Cerdá-Reverter y Canosa, 2009, Mc Donald, 2017; De Abreu et al., 2020). En peces expuestos a FLX, se ha reportado un efecto de hipocortisolismo y disminución de la respuesta de estrés en ciertas especies, con disminución de los niveles basales de cortisol y respuesta atenuada ante un agente estresor (De Abreu et al., 2014, 2015; Miranda et al., 2023; Vera Chang et al., 2018, 2019). En contraposición, en otras especies se evidenció una ausencia de efecto o incluso un aumento de los niveles circulantes de cortisol (Sebire et al., 2015; Wolkers et al., 2017; De Abreu et al., 2020; Theodoridi et al., 2017; Petrunich-Rutherford, 2019; Al Shuraiqi et al., 2021). Es posible que los efectos observados en las distintas especies dependan del diseño experimental empleado en cada estudio (estadio del desarrollo, concentración, duración del tratamiento, régimen de exposición) y en última instancia señalan la imposibilidad de hacer generalizaciones.

En este trabajo, se propuso estudiar el efecto de la exposición a FLX sobre los niveles de cortisol de *C. decemmaculatus* y *G. holbrooki*. Sin embargo, el límite de detección de la técnica de ELISA no fue suficiente para la mayoría de las lecturas, por lo que no fue posible extraer información sobre las mismas. Ante la posibilidad de que hubiera ocurrido una degradación del cortisol en las muestras congeladas, se procedió a realizar las determinaciones de los ensayos E5 y E6 sobre las muestras frescas inmediatamente después de obtenerlas. En estos casos, fue posible obtener datos sobre los niveles endógenos de cortisol, pero no es posible extraer conclusiones debido al reducido número de muestras (que corresponden a pseudoréplicas ya que los cinco individuos provinieron de un único acuario) y la alta variación entre las respectivas lecturas, sumado a que éstas se encontraron cercanas al límite inferior de la curva de calibración empleada. A modo

preliminar, en *C. decemmaculatus* se observó una tendencia a mayores niveles de cortisol en individuos expuestos a FLX que en el control, mientras que en *G. holbrooki* no habría un efecto de la FLX sobre los niveles de cortisol. Es importante notar que estos registros mostrarían valores de cortisol en peces que no fueron sometidos a la arena experimental individual en la que se registró la actividad natatoria, lo que podría haber constituido un factor de estrés con potencial influencia sobre los resultados. De haber contado con registros para los ensayos E1-E4, se habría podido cotejar los resultados con los de los ensayos E5 y E6 a fin de estimar este efecto.

En consecuencia, se puede concluir que la técnica empleada y/o el almacenamiento de las muestras para la determinación de cortisol no fue el apropiado, y que habría contar con un mayor número de registros para evaluar el efecto de la FLX sobre los niveles endógenos de cortisol. Por lo tanto, la hipótesis de trabajo 3 (la exposición a FLX produce una modificación de los niveles endógenos de cortisol) no pudo ponerse a prueba correctamente.

Limitaciones del estudio

Recientemente, Sumpter et al. (2023) han destacado la importancia de discutir las limitaciones que se presentan en los estudios ecotoxicológicos, así como en otras áreas de la investigación científica. Resulta crucial reconocer y comunicar las limitaciones inherentes a los estudios científicos para así poder garantizar la integridad y la transparencia en la investigación. Cada estudio enfrenta desafíos metodológicos, restricciones de recursos y posibles fuentes de sesgo que pueden afectar la validez y generalización de los resultados. Al expresar estas limitaciones, los científicos permiten que la comunidad académica y el público en general comprendan las restricciones contextuales de sus hallazgos, promoviendo una interpretación más precisa y prudente de los resultados y favoreciendo la reproducibilidad de los mismos.

Si bien fue posible extraer conclusiones sobre los registros obtenidos, este trabajo de tesis, como cualquier trabajo científico, contó con limitaciones inherentes al balance entre tiempo y recursos disponibles que se realiza a la hora de diseñar los experimentos.

Las limitaciones más destacables en este estudio fueron un tamaño muestral relativamente pequeño, la utilización de hembras exclusivamente, el registro de la actividad natatoria en individuos aislados y el posible efecto de estacionalidad sobre el comportamiento de las especies, a pesar de haber realizado los experimentos en un entorno aislado de la influencia del ambiente natural.

Tener un tamaño muestral pequeño en un trabajo de investigación puede limitar significativamente la validez y generalización de los resultados obtenidos, ya que puede generar conclusiones sesgadas o no representativas de la población total, lo que compromete la fiabilidad de los hallazgos. A su vez, la significancia biológica de un resultado puede no verse reflejada a nivel estadístico cuando el tamaño muestral no es lo suficientemente grande. En el presente trabajo, un incremento del número de réplicas, y por lo tanto del número de registros, posiblemente hubiera permitido confirmar más claramente la significancia estadística de los efectos observados para el tratamiento FLX 5 en la especie nativa *C. decemmaculatus*.

Por otro lado, la estacionalidad registrada para el comportamiento social y reproductivo, tanto para *C. decemmaculatus* (Baudou, 2019) como para *G. holbrooki* (Martin, 1975; Edwards et al., 2010) puede ser una fuente de error al generar sesgos temporales en las observaciones. En este trabajo, cada ensayo fue realizado con una única réplica por tratamiento debido a la imposibilidad de contar con un número suficiente de animales de tamaño homogéneo que permitiera incrementar el número de réplicas. Debido a este impedimento, fue necesario repetir los ensayos y considerar a los respectivos tratamientos como réplicas diferidas en el tiempo. A la hora de repetir los experimentos, se emplearon peces provenientes de los mismos sitios de colecta, ya que es sabido que la respuesta de los organismos en ensayos ecotoxicológicos puede depender de su procedencia geográfica y/o estructura genética. Ahora bien, dado que no fue posible repetir los ensayos en una misma época del año, cabe la posibilidad de que haya existido un efecto estacional sobre los comportamientos registrados. Incluso habiendo realizado los experimentos en un espacio aislado de influencias externas, no es posible descartar algún efecto de ritmicidad circanual en peces provenientes del ambiente natural. En este sentido, la alta variabilidad de los datos correspondientes al comportamiento agresivo entre los tres ensayos realizados en cada especie puede obedecer, al menos parcialmente, a esta causa. Por el contrario, los datos correspondientes a la actividad natatoria mostraron mayor uniformidad entre ensayos. Sin embargo, es posible que el comportamiento agresivo tenga una mayor variabilidad intrínseca entre individuos que la actividad natatoria, independientemente de la influencia estacional.

El uso de animales de un solo sexo conlleva limitaciones en cuanto a la representatividad de los resultados. La biología y el comportamiento de los organismos de distintos sexos suele variar significativamente, y la exclusión de uno de ellos podría conducir a una comprensión limitada de las interacciones ecológicas. Además, la omisión de un sexo puede obstaculizar la extrapolación de los resultados a poblaciones completas, ya que la respuesta ecológica puede depender de la interacción entre ambos sexos. En este estudio,

se emplearon hembras únicamente debido al mayor tamaño de los ejemplares y a fin de evitar el acoso por parte de los machos. Sin embargo, sería necesario realizar nuevos experimentos, incluyendo individuos de ambos sexos, con el fin de verificar los resultados obtenidos bajo un contexto de mayor relevancia ecológica. En este sentido, diversos autores resaltan actualmente la importancia de incorporar el contexto social en los ensayos ecotoxicológicos (Martin y McCallum, 2021; Bertram et al., 2022) ya que el entorno social puede modular el efecto de los contaminantes actuando a distintos niveles de organización biológica (Martin y McCallum, 2021; Mason et al., 2021).

En este trabajo, los registros de actividad natatoria fueron realizados en forma individual, debido a impedimentos relacionados con las capacidades tecnológicas del software empleado (imposibilidad de hacer registros grupales). Nuevamente, este tipo de análisis no representa un contexto de relevancia ambiental, al menos en especies sociales como los poecíldos, ya que los efectos observados en individuos aislados podrían no reflejar el impacto en un contexto de interacciones sociales. Por lo tanto, dado que las interacciones entre coespecíficos pueden modular la locomoción, sería necesario confirmar el efecto atenuante de la FLX sobre la actividad natatoria a partir de registros grupales. De todos modos, si bien dichos registros no pudieron implementarse, las observaciones realizadas en cada acuario durante el período de exposición permitieron confirmar cualitativamente los efectos determinados a nivel individual.

Por otra parte, al igual que en cualquier otro trabajo de laboratorio, los resultados obtenidos en este estudio no deben extrapolarse en forma directa al ambiente natural, en el cual confluyen diversos factores que incrementan la complejidad del sistema, sino que deben tomarse como parámetros de referencia sobre posibles alteraciones causadas por el tipo de contaminante evaluado sobre los organismos silvestres.

Finalmente, es necesario señalar que la discrepancia sobre los efectos de la FLX reportados en la literatura para peces teleósteos podría deberse a las diferencias metodológicas entre los estudios. Estas podrían incluir diferencias en las concentraciones de ensayo, el régimen de exposición empleado, las especies seleccionadas, el sexo, la edad, y los métodos utilizados para evaluar el comportamiento.

Conclusiones

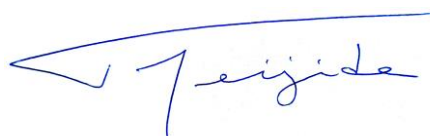
En conjunto, los resultados de este trabajo de tesis revelaron que la exposición al fármaco antidepressivo FLX produce un incremento del comportamiento agresivo y una alteración de la actividad natatoria en dos especies de poecílidos que integran la ictiofauna de agua dulce de nuestro país, la madrecita *C. decemmaculatus* y el pez mosquito *G. holbrooki*. Para ambas especies, los efectos resultaron significativos a concentraciones superiores a las de relevancia ambiental.

Por otro lado, el análisis comparativo entre ambas especies reveló una mayor susceptibilidad de *C. decemmaculatus* en comparación con *G. holbrooki* frente a la exposición a FLX. Esta diferencia podría tener implicancias ecológicas relevantes, sugiriendo la posibilidad de una ventaja adaptativa para la especie exótica a expensas de la especie nativa. Este fenómeno podría potenciar la capacidad invasora de la especie introducida, especialmente en un contexto de contaminación del medio acuático por fármacos neuroactivos capaces de alterar el comportamiento. Por lo tanto, sería importante extender estos estudios, evaluando posibles alteraciones del comportamiento de especies nativas y exóticas que ocupen un mismo nicho ecológico ante exposiciones de mayor duración a concentraciones de relevancia ambiental de FLX y otros fármacos, incluyendo el efecto de mezclas. Asimismo, sería interesante analizar las interacciones entre especies nativas y exóticas en presencia y ausencia de este tipo de contaminantes, a fin de evaluar potenciales efectos sobre la capacidad competitiva de unas sobre otras. De este modo, se estaría abordando la interacción entre contaminación química y especies invasoras, dos de los procesos que actualmente amenazan la biodiversidad a escala global.

Por último, resulta imperativo continuar investigando los potenciales efectos adversos de la contaminación química con fármacos para comprender mejor los riesgos que estas sustancias implican para los organismos acuáticos. Estudios adicionales podrían proporcionar información valiosa para orientar prácticas más sostenibles en la producción, prescripción y eliminación de los fármacos, minimizando así posibles impactos negativos en los ecosistemas acuáticos.



Martina Kolesnik



Fernando J. Meijide

Referencias bibliográficas

- Agerstrand, M., Arnold, K., Balshine, S., Brodin, T., Brooks, B. W., Maack, G., McCallum, E. S., Pyle, G., Saaristo, M., & Ford, A. T. (2020). Emerging investigator series: use of behavioral endpoints in the regulation of chemicals. *Environmental Science Processes and Impacts*, 22, 49-65.
- Al Shuraiqi, A., Al-Habsi, A., & Barry, M.J. (2021). Time-, dose-and transgenerational effects of fluoxetine on the behavioural responses of zebrafish to a conspecific alarm substance. *Environmental Pollution*, 270, 116164.
- Alcaraz, C., & García-Berthou, E. (2007). Life history variation of invasive mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) along a salinity gradient. *Biological Conservation*, 139(1-2), 83-92.
- Alfonso, S., Houdelet, C., Bessa, E., Geffroy, B., & Sadoul, B. (2023). Water temperature explains part of the variation in basal plasma cortisol level within and between fish species. *Journal of Fish Biology*, 103(4), 828-838.
- Almirón, A., Gómez, S., & Toresani, N. (1992). Peces de agua dulce de la provincia de Buenos Aires. En: *Situación ambiental de la provincia de Buenos Aires*, 2(12), H.L. López & E.P. Toni (eds.). Buenos Aires, Argentina, pp.1-29.
- Almond, R. E., Grooten, M., & Peterson, T. (2020). *Living Planet Report 2020-Bending the curve of biodiversity loss*. World Wildlife Fund. Gland, Suiza.
- Amiard-Triquet, C. (2009). Behavioral Disturbances: The missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Human and Ecological Risk Assessment*, 15(1), 87-110.
- Andreoli Bize, J., & Fernandez, L. A. (2019). Invasion alert: new record of the exotic *Gambusia holbrooki* Girard, 1859 in the Puna Austral region, Northwestern of Argentina. *Neotropical Biology and Conservation*, 14(2), 291-295.
- Ansai, S., Hosokawa, H., Maegawa, S., Kinoshita, M. (2016). Chronic fluoxetine treatment induces anxiolytic responses and altered social behaviors in medaka *Oryzias latipes*. *Behavioural Brain Research*, 303, 126-136.
- Arcaute Ruiz, C., Ossana, N. A., Pérez-Iglesias, J. M., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2019). Auxinic herbicides induce oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 20485-20498.
- Arnold, K. E., Brown, A. R., Ankley, G. T., & Sumpter, J. P. (2014). Medicating the environment: assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 369(1656), 20130569.

- Arnnok, P., Singh, R. R., Burakham, R., Perez-Fuentetaja, A., & Aga, D. S. (2017). Selective uptake and bioaccumulation of antidepressants in fish from effluent-impacted Niagara River. *Environmental Science and Technology*, 51, 10652-10662.
- Asante-Duah, K. (2002). Public Health Risk Assessment for Human Exposure to Chemicals. *Environmental Pollution*, 6, 19-42.
- AVMA. (2020). Guidelines for the Euthanasia of Animals. American Veterinary Medical Association. Illinois, Estados Unidos.
- Backström, T., Heynena, M., Brännäsa, E., Nilssona, J., Winberg, S., Magnhagena, C. (2015). Social stress effects on pigmentation and monoamines in Arctic charr. *Behavioural Brain Research*, 291, 103-107.
- Backström, T., & Winberg, S. (2017). Serotonin coordinates responses to social stress-What we can learn from fish. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 595.
- Baker, M. R., Gobush, K. S., & Vynne, C. H. (2013). Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife. *Journal for Nature Conservation*, 21(5), 309-318.
- Barry, M. J. (2013). Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. *Ecotoxicology*, 22, 425-432
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 517-525.
- Baudou, F. G., Ossana, N. A., Castañé, P. M., Mastrángelo, M. M., & Ferrari, L. (2017). Cadmium effects on some energy metabolism variable in *Cnesterodon decemmaculatus* adults. *Ecotoxicology*, 26(9), 1250-1258
- Baudou, F. G. (2019). Evaluación de efectos ecofisiológicos y ecotoxicológicos en *Cnesterodon decemmaculatus* bajo condiciones de estrés ambiental. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Bell, K. Y., Wells, M. J., Traexler, K. A., Pellegrin, M. L., Morse, A., & Bandy, J. (2011). Emerging pollutants. *Water Environment Research*, 83(10), 1906-1984.
- Bernal-Rey, D. L., dos Santos Afonso, M. & Menendez-Helman, R. J. (2017). Effects of chlorpyrifos on acetylcholinesterase activity in two freshwater fish species (*Cnesterodon decemmaculatus* and *Gambusia affinis*). *International Journal of Environmental Health Research*, 8(4), 316-330.
- Bernal-Rey, D. L., Cantera, C. G., dos Santos Afonso, M., & Menéndez-Helman, R. J. (2020). Seasonal variations in the dose-response relationship of acetylcholinesterase activity in freshwater fish exposed to chlorpyrifos and glyphosate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187, 1-9.

- Bertram, M. G.; Ecker, T. E.; Wong, B. B. M.; O'Bryan, M. K.; Baumgartner, J. B.; Martin, J. M., & Saaristo, M. (2018). The antidepressant fluoxetine alters mechanisms of pre- and post-copulatory sexual selection in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Environmental Pollution*, 238, 238-47.
- Bertram, M. G., Tomkins, P., Saaristo, M., Martin, J. M., Michelangeli, M., Tomkins, R. B., & Wong, B. B. (2020). Disruption of male mating strategies in a chemically compromised environment. *Science of the Total Environment*, 703, 134991.
- Bertram, M. G., Martin, J. M., McCallum, E. S., Alton, L. A., Brand, J. A., Brooks, B. W., Cervený, D. ... & Brodin, T. (2022). Frontiers in quantifying wildlife behavioural responses to chemical pollution. *Biological Reviews*, 97, 1346-1364.
- Blanchard, R. J., McKittrick, C. R., & Blanchard, D. C. (2001). Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology and Behaviour*, 73, 261-271.
- Blanco, S., Romo, S., & Villena, M. J. (2004). Experimental study on the diet of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) under different ecological conditions in a shallow lake. *International Review of Hydrobiology: A Journal Covering All Aspects of Limnology and Marine Biology*, 89(3), 250-262.
- Boaru, A., Struți, D., & Georgescu, B. (2021). Poeciliidae fish as a model organism. *Poeciliid Research*, 11(1), 12-17.
- Bonifacio, A. F., Cazenave, J., & Bacchetta, C. (2016). Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecological Indicators*, 67, 88-97.
- Bonifacio, A. F., Zambrano, M., & Hued, A. C. (2020). Integrated ecotoxicological assessment of the complex interactions between chlorpyrifos and glyphosate on a non-target species *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Chemosphere*, 261, 127782.
- Brander, S., Hecht, S., & Kuivila, K. (2015). The challenge: "Bridging the gap" with fish: advances in assessing exposure and effects across biological scales. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(3), 459.
- Brodin T, Piovano S, Fick J, Klaminder J, Heynen M, & Jonsson M. (2014). Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems - Impacts through behavioural alterations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656), 20130580.
- Brooks, B. W., Foran, C. M., Richards, S. M., Weston, J., Turner, P. K., Stanley, J. K., Solomon, K. R., Slattery, M., & La Point, T.W. (2003). Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology Letters*, 142(3), 169-183.

- Brooks, B. W., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramirez, A., Banks, K. E., Johnson, R. D., & Lewis, R. J. (2005). Determination of select antidepressants in fish from an effluent dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 464-469.
- Cabral, J. A., Ávila, S., & Marques, J. C. (1999). Acute and sublethal effects of a non-ionic surfactant, Genapol OXD-080, on mosquitofish *Gambusia holbrooki* (Girard). *Ecotoxicology*, 8, 245-252.
- Cabrera, M. B., Bogan, S., Posadas, P., Somoza, G. M., Montoya-Burgos, J. I., & Cardoso, Y. P. (2017). Risks associated with introduction of poeciliids for control of mosquito larvae: first record of the non-native *Gambusia holbrooki* in Argentina. *Journal of Fish Biology*, 91(2), 704-710.
- Campos, L. B., Núñez, A. G., Palacio, M. J., Ferro, J. P., Castañé, P. M., Ferrari, L., & Ossana, N. A. (2023). Acute and subchronic effects of ibuprofen on the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Chemosphere*, 340, 139895.
- Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., ... & Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401), 59-67.
- Carrizo, V., Valenzuela, C. A., Zuloaga, R., Aros, C., Altamirano, C., Valdés, J. A., & Molina, A. (2021). Effect of cortisol on the immune-like response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myotubes challenged with *Piscirickettsia salmonis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 237, 110240.
- CCAC. (2005). Guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing. Canadian Council on Animal Care. Ontario, Canadá.
- Cerdá-Reverter, J. M., & Canosa, L. F. (2009). Neuroendocrine systems of the fish brain. *Fish Physiology*, 28, 3-74.
- Christen, V., Hickmann, S., Rechenberg, B., & Fent, K. (2010). Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: a concept for their identification based on their mode of action. *Aquatic Toxicology*, 96(3), 167-181.
- Clements, W. H., & Rohr, J. R. (2009). Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 1789-1800.
- Colville, C., Alcaraz, A. J., Green, D., Park, B., Xia, J., Soufan, O., ... & Hecker, M. (2022). Characterizing toxicity pathways of fluoxetine to predict adverse outcomes in adult fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Science of the Total Environment*, 817, 152747.
- Correa, J. B., & Pérez-Torres, J. (2016). Functional diversity: a key aspect in the provision of ecosystem services. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 8(1), 94-111.

- Correia, D., Domingues, I., Faria, M., Oliveira, M. (2022). Chronic effects of fluoxetine on *Danio rerio*: a biochemical and behavioral perspective. *Applied Sciences*, 12, 2256.
- Correia, D., Domingues, I., Faria, M., & Oliveira, M. (2023). Effects of fluoxetine on fish: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of the Total Environment*, 857, 159486.
- Costa, C., Semedo, M., Machado, S. P., Cunha, V., Ferreira, M., & Urbatzka, R. (2021). Transcriptional analyses reveal different mechanism of toxicity for a chronic exposure to fluoxetine and venlafaxine on the brain of the marine fish *Dicentrarchus labrax*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 250, 109170.
- Cribb, J. (2021). *Earth Detox: How and why we must clean up our planet*. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.
- Data Bridge Market Research (2022). *Global Fluoxetine Market - Industry Trends and Forecast to 2029*. <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-fluoxetine-market>.
- Cunha, V.; Rodrigues, P.; Santos, M. M.; Moradas-Ferreira, P.; Ferreira, M. (2018). Fluoxetine modulates the transcription of genes involved in serotonin, dopamine and adrenergic signalling in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 191, 954-61.
- Da Silva, J. R. M. C., Bergami, E., Gomes, V., & Corsi, I. (2023). Occurrence and distribution of legacy and emerging pollutants including plastic debris in Antarctica: Sources, distribution and impact on marine biodiversity. *Marine Pollution Bulletin*, 186, 114353.
- De Abreu, M. S., Koakoski, G., Ferreira, D., Acosta Oliveira, T., Santos Da Rosa, J. G., Gusso, D., Giacomini, A. C. V., Piato, A. L., Barcellos, L. J. G. (2014). Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. *PLoS One*, 9, 1-5.
- De Abreu, M. S., Giacomini, A. C. V., Koakoski, G., Oliveira, T. A., Gusso, D., Baldisserotto, B., Barcellos, L. J. G. (2015). Effects of waterborne fluoxetine on stress response and osmoregulation in zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(3), 704-707.
- De Abreu, M. S., Maximino, C., Cardoso, S. C., Marques, C. I., Pimentel, A. F., Mece, E., Winberg, S., Barcellos, L. J., & Soares, M. C. (2020). Dopamine and serotonin mediate the impact of stress on cleaner fish cooperative behavior. *Hormones and Behaviour*, 125, 104813.
- De Farias, N. O., Oliveira, R., Moretti, P. N. S., e Pinto, J. M., Oliveira, A. C., Santos, V. L., ... & Grisolia, C. K. (2020). Fluoxetine chronic exposure affects growth, behavior and tissue structure of zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 237, 108836.

- De la Torre, F. R., Ferrari, L., & Salibián, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*, 59(4), 577-583.
- De la Torre, F.R., Salibian, A. & Ferrari, L. (2007). Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere*, 68, 1582-1590.
- Di Baccio, D., Pietrini, F., Bertolotto, P., Pérez, S., Barcelò, D., Zacchini, M., & Donati, E. (2017). Response of *Lemna gibba* L. to high and environmentally relevant concentrations of ibuprofen: Removal, metabolism and morpho-physiological traits for biomonitoring of emerging contaminants. *Science of the Total Environment*, 584, 363-373.
- Dijkstra, P. D, Maguire, S. M, Harris, R. M, Rodriguez, A. A, DeAngelis, R. S, Flores, S. A, Hofmann, H. A. (2017). The melanocortin system regulates body pigmentation and social behaviour in a colour polymorphic cichlid fish. *Proceedings of the Royal Society B*, 284, 20162838.
- Douglas Martin, F., & Hengstebeck, M. (1981). Eye colour and aggression in juvenile guppies, *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Animal Behaviour*, 29(2), 325-331.
- Dziewieczynski, T. L., & Hebert, O. L. (2012). Fluoxetine alters behavioral consistency of aggression and courtship in male Siamese fighting fish *Betta splendens*. *Physiology and Behaviour*, 107, 92-97.
- DrugStats Database. (2019). <https://clincalc.com/DrugStats/Drugs/Fluoxetine>. (Consultado el 2 de febrero de 2024).
- Duarte, I. A., Pais, M. P., Reis-Santos, P., Cabral, H. N., & Fonseca, V. F. (2019). Biomarker and behavioural responses of an estuarine fish following acute exposure to fluoxetine. *Marine Environmental Research*, 147, 24-31.
- Duffy, J. E. (2009). Why biodiversity is important to the functioning of real world ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(8), 437-444.
- ECA. (2011). Guidance on information requirements and chemical safety assessment - Part B: Hazard assessment. European Chemicals Agency. Helsinki, Finlandia.
- Edwards, T. M., Toft, G., & Guillette Jr, L. J. (2010). Seasonal reproductive patterns of female *Gambusia holbrooki* from two Florida lakes. *Science of the Total Environment*, 408(7), 1569-1576.
- EEA. (2018). Chemicals for a Sustainable Future: Report of the EEA Scientific Committee Seminar. European Environment Agency. Copenhagen, Dinamarca.
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Tien, A. K., Tien, D. H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioural and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 205, 38-44.

- Eisenreich, B. R., & Szalda-Petree, A. (2015). Behavioral effects of fluoxetine on aggression and associative learning in siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes*, 121, 37-42.
- Eisenreich, B. R., Greene, S., & Szalda-Petree, A. (2017). Of fish and mirrors: Fluoxetine disrupts aggression and learning for social rewards. *Physiology and Behavior*, 173, 258-262.
- Eissa, B. L., Ferrari, L., Ossana, N. A., & Salibian, A. (2006). Biomarcadores etológicos no invasivos de estrés ambiental: estudio comparativo en dos teleósteos de ecosistemas de la región pampeana argentina. *Revista de Toxicología*, 23, 11-16.
- Eissa, B. L. N. & Ossana, N. A. (2021). Alteraciones del comportamiento. En: *Principios de Ecotoxicología*. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.
- Ferrari, L., Benítez, J., Ficella, M., Mastrángelo, M., Somma, A., Palacio, M., & Trípoli, L. (2017). Manual de procedimiento básico para la cría de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio. Universidad Nacional de Luján. Editorial EdUnLu.
- Ferro, J. P., Campos, L. B., Ossana, N. A., Ferrari, L., & Eissa, B. L. (2019). Effects of cadmium on the behaviour of *Cnesterodon decemmaculatus*. *International Journal of Environment and Health*, 9(4), 372-379.
- Fields, S., & Johnston, M. (2005). Whither model organism research? *Science*, 307(5717), 1885-1886.
- Ford, A. T., Agerstrand, M., Brooks, B. W., Allen, J., Bertram, M. G., Brodin, T., Dang, Z. C., Duquesne, S., Sahm, R., Hoffmann, F., Hollert, H., Jacob, S., ..., & Maack, G. (2021). The role of behavioral ecotoxicology in environmental protection. *Environmental Science and Technology*, 55, 5620-5628.
- Forsatkar, M. N., Nematollahi, M. A., Amiri, B. M., & Huang, W. B. (2014). Fluoxetine inhibits aggressive behaviour during parental care in male fighting fish (*Betta splendens*, Regan). *Ecotoxicology*, 23 (9), 1794-1802.
- Fuller, R. W., Wong, D. T., & Robertson, D. W. (1991). Fluoxetine, a selective inhibitor of serotonin reuptake. *Medicinal Research Reviews*, 11(1), 17-34.
- Fursdon, J. B., Martin, J. M., Bertram, M. G., Lehtonen, T. K., Wong, B. B. (2019). The pharmaceutical pollutant fluoxetine alters reproductive behaviour in a fish independent of predation risk. *Science of the Total Environment*, 650, 642-652.
- García-Berthou, E., Alcaraz, C., Pou-Rovira, Q., Zamora, L., Coenders, G., & Feo, C. (2005). Introduction pathways and establishment rates of invasive aquatic species in Europe. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(2), 453-463.
- Gaworecki, K. M., & Klaine, S. J. (2008). Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. *Aquatic Toxicology*, 88, 207-213.

- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., van der Zee, S & Ritsema, C. J. (2015). Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(1), 57-65.
- Ghazal, H. (2023). Pharmaceuticals contamination in the environment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 103, 104251.
- Godin, J. G. J. (1997). Evading predators. En: Behavioral ecology of teleost fishes. Oxford University Press, Oxford, pp. 191-236.
- Gómez, S., Villar, C., & Bonetto, C. (1998). Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Río de La Plata Estuary. *Environmental Pollution*, 99(2), 159-165.
- Gonzalez Núñez, A. A., Ferro, J. P., Campos, L. B., Eissa, B. L., Mastrángelo, M. M., Ferrari, L., & Ossana, N. A. (2022). Evaluation of the acute effects of arsenic on adults of the neotropical native fish *Cnesterodon decemmaculatus* using a set of biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(5), 1246-1259.
- Gould, S. L., Winter, M. J., Norton, W. H. J., & Tyler, C. R. (2021). The potential for adverse effects in fish exposed to antidepressants in the aquatic environment. *Environmental Science and Technology*, 55, 16299-16312.
- Grabicova, K., Lindberg, R.H., Östman, M., Grabic, R., Randak, T., Joakim Larsson, D.G., Fick, J. (2014). Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant. *Science of the Total Environment*, 488-489, 46-50.
- Grant, J. W., Girard, I. L., Breau, C., & Weir, L. K. (2002). Influence of food abundance on competitive aggression in juvenile convict cichlids. *Animal Behaviour*, 63(2), 323-330.
- Greaney, N. E., Mannion, K. L., & Dziewieczynski, T. L. (2015). Signaling on prozac: altered audience effects on male-male interactions after fluoxetine exposure in siamese fighting fish. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 69(12), 1925-1932.
- Gruber, K. (2018). Cleaning up pollutants to protect future health. *Nature*, 555, S20-S22.
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, J. (2008). Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environmental Science and Technology*, 42, 5807-13.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1.
- Magnhagen, C., Braithwaite, V., Forsgren, E., Kapoor, B. G., & Magurran, A. E. (2008). Fish behaviour. Boca Raton, Taylor & Francis.
- Hay-Schmidt, A. (2000). The evolution of the serotonergic nervous system. *Proceedings of the Royal Society B*, 267(1448), 1071-1079.

- Hellou, J. (2011). Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research*, 18, 1-11.
- Hemond, H. F., & Fechner-Levy, E. (2015). Chemical fate and transport in the environment. Tercera edición. Academic Press. Londres, Reino Unido.
- Henry, T. B., & Black, M. C. (2008). Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(2), 325-330.
- Hiemke, C., & Härtter, S. (2000). Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics*, 85(1), 11-28.
- Higgins, K. L. (2021). Social behaviour, aggression and the indirect effects of competition and predation in the fish species *Galaxias maculatus* and *Gambusia holbrooki*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Instituto de Estudios Marinos y Antárticos. Universidad de Tasmania. Australia.
- Horth, L. (2008). Melanic body colour and aggressive mating behaviour are correlated traits in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270, 1033-1040.
- Howell, W. M., Black, D. A., & Bortone, S. A. (1980). Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally-induced masculinization. *Copeia*, 1980(4), 676-681.
- Hu, L., Luo, D., Wang, L., Yu, M., Zhao, S., Wang, Y., ... & Zhang, G. (2021). Levels and profiles of persistent organic pollutants in breast milk in China and their potential health risks to breastfed infants: A review. *Science of the Total Environment*, 753, 142028.
- Huang, I. J., Sirotkin, H. I., McElroy, A. E. (2019). Varying the exposure period and duration of neuroactive pharmaceuticals and their metabolites modulates effects on the visual motor response in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Neurotoxicology and Teratology*, 72, 39-48.
- Hued, A. C. & Bistoni, M. D. (2005). Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia*, 543(1), 279-298.
- Huggett, D. B., Cook, J. C., Ericson, J. F., & Williams, R. T. (2003). Theoretical model for prioritizing potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Human and Ecological Risk Assessment*, 9(7), 1789-1799.
- Hughes, S. R., Kay, P., & Brown, L. E. (2013). Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. *Environmental Science and Technology*, 47, 661-677.
- IPBES (2019). Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity

- and Ecosystem Services. S. Díaz, J. Settele, E. S. Brondízio E.S., H. T. Ngo, M. Guèze, J. Agard, A. Arneth, P. Balvanera, K. A. Brauman, S. H. M. Butchart, K. M. A. Chan, L. A., ..., & C. N. Zayas (eds.). *IPBES secretariat, Bonn, Germany*.
- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación) (2008). Calidad ambiental- Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. Norma N° 29112/2008.
 - Jaureguiberry, P., Titeux, N., Wiemers, M., Bowler, D. E., Coscieme, L., Golden, A. S., Guerra, C. A., Jacob, U., Takahashi, Y., Settele, J., Díaz, S., Molnár, Z., & Purvis, A. (2022). The direct drivers of recent global anthropogenic biodiversity loss. *Science Advances*, 8, eabm9982.
 - Jelic, A., Fatone, F., Di Fabio, S., Petrović, M., Cecchi, F., & Barcelo, D. (2012). Tracing pharmaceuticals in a municipal plant for integrated wastewater and organic solid waste treatment. *Science of the Total Environment*, 433, 352-361.
 - Johnson, C. N., Balmford, A., Brook, B. W., Buettel, J. C., Galetti, M., Guangchun, L., & Wilmschurst, J. M. (2017). Biodiversity losses and conservation responses in the Anthropocene. *Science*, 356(6335), 270-275.
 - Kania, B.F., Gralak, M.A., & Wielgosz, M. (2012). Four-week fluoxetine (SSRI) exposure diminishes aggressive behaviour of male Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Journal of Behavioral and Brain Science*, 2, 185-190.
 - Kar, S., Sangem, P., Anusha, N., & Senthilkumaran, B. (2021). Endocrine disruptors in teleosts: Evaluating environmental risks and biomarkers. *Aquaculture and Fisheries*, 6(1), 1-26.
 - Khan, A. H. A., & Barros, R. (2023). Pharmaceuticals in Water: Risks to Aquatic Life and Remediation Strategies. *Hydrobiology*, 2, 395-409.
 - Kohlert, J. G., Mangan, B. P., Kodra, C., Drako, L., Long, E., & Simpson, H. (2012). Decreased aggressive and locomotor behaviors in *Betta splendens* after exposure to fluoxetine. *Psychological Reports*, 110, 51-62.
 - Kreke, N., & Dietrich, D. R. (2008). Physiological endpoints for potential SSRI interactions in fish. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(3), 215-47.
 - Kumar, M., Sridharan, S., Sawarkar, A. D., Shakeel, A., Anerao, P., Mannina, G., ... & Pandey, A. (2023). Current research trends on emerging contaminants pharmaceutical and personal care products (PPCPs): A comprehensive review. *Science of the Total Environment*, 859, 160031.
 - Kumazawa, T., & Fujii, R. (1984). Concurrent releases of norepinephrine and purines by potassium from adrenergic melanosome-aggregating nerve in tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78C, 263-266.

- Kwon, J. W., & Armbrust, K. L. (2006). Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(10), 2561-2568.
- Laffoley, D., & Baxter, J. M. (2019). *Ocean deoxygenation: Everyone's problem: Causes, impacts, consequences and solutions: Summary for Policy Makers*. International Union for Conservation of Nature (IUCN). Gland, Suiza.
- Laha, M., & Mattingly, H. T. (2007). Ex situ evaluation of impacts of invasive mosquitofish on the imperiled Barrens topminnow. *Environmental Biology of Fishes*, 78, 1-11.
- Lei, M., Zhang, L., Lei, J., Zong, L., Li, J., Wu, Z., & Wang Z. (2015). Overview of Emerging Contaminants and Associated Human Health Effects. *BioMed Research International*, 2015, 404796.
- Lemos, L. S., Angarica, L. M., Hauser-Davis, R. A., & Quinete, N. (2023). Cortisol as a Stress Indicator in Fish: Sampling Methods, Analytical Techniques, and Organic Pollutant Exposure Assessments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(13), 6237.
- Lenzi, D., Balvanera, P., Arias-Arévalo, P., Eser, U., Guibrunet, L., Martin, A., ... & Pascual, U. (2023). Justice, sustainability, and the diverse values of nature: why they matter for biodiversity conservation. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 64, 101353.
- Levitis, D. A., Lidicker, W. Z., & Freund, G. (2009). Behavioural biologists do not agree on what constitutes behaviour. *Animal Behaviour*, 78, 103-110.
- Lillesaar, C. (2011). The serotonergic system in fish. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 41(4), 294-308.
- Lindeyer, C. M., Langen, E. M. A., Swaney, W. T., & Reader, S. M. (2015). Nonapeptide influences on social behaviour: effects of vasotocin and isotocin on shoaling and interaction in zebrafish. *Behaviour*, 152, 897-915.
- Little, E.E., & Finger, S.E. (1990). Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 13-19.
- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., & Van Der Kraak, G. (2009). Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation. *Aquatic Toxicology*, 95, 320-329.
- Liu, L., Zhong, M., Dong, J., Chen, M., Shang, J., & Yue, Y. (2020). 5-Hydroxytryptamine (5-HT) positively regulates pigmentation via inducing melanoblast specification and melanin synthesis in zebrafish embryos. *Biomolecules*, 10, 1344.
- Lucinda, P. H. (2005). Systematics of the genus *Cnesterodon garman*, 1895 (cyprinodontiformes: poeciliidae: poeciliinae). *Neotropical Ichthyology*, 3, 259-270.

- Margiotta-Casaluci, L., Owen, S. F., Cumming, R. I., De Polo, A., Winter, M. J., Panter, G. H., ... & Sumpter, J. P. (2014). Quantitative cross-species extrapolation between humans and fish: the case of the anti-depressant fluoxetine. *PLoS One*, 9(10), e110467.
- Martin, R. G. (1975). Sexual and aggressive behavior, density and social structure in a natural population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*. *Copeia*, 445-454.
- Martin, J. M., Saaristo, M., Bertram, M. G., Lewis, P. J., Coggan, T. L., Clarke, B. O., & Wong, B. B. M. (2017). The psychoactive pollutant fluoxetine compromises antipredator behavior in fish. *Environmental Pollution*, 222, 592-599.
- Martin, J. M., Saaristo, M., Tan, H., Bertram, M. G., Nagarajan-Radha, V., Dowling, D. K., & Wong, B. B. (2019a). Field-realistic antidepressant exposure disrupts group foraging dynamics in mosquitofish. *Biology Letters*, 15(11), 20190615.
- Martin, J. M., Bertram, M. G., Saaristo, M., Fursdon, J. B., Hannington, S. L., Brooks, B. W., ... & Wong, B. B. (2019b). Antidepressants in surface waters: fluoxetine influences mosquitofish anxiety-related behavior at environmentally relevant levels. *Environmental Science & Technology*, 53(10), 6035-6043.
- Martin, J. M., Nagarajan-Radha, V., Tan, H., Bertram, M. G., Brand, J. A., Saaristo, M., ... & Wong, B. B. (2020). Antidepressant exposure causes a nonmonotonic reduction in anxiety-related behaviour in female mosquitofish. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 1, 100004.
- Martin, J. M. & McCallum, E. S. (2021). Incorporating animal social context in ecotoxicology: can a single individual tell the collective story? *Environmental Science & Technology*, 55, 10908-10910.
- Martinez, R., Vera-Chang, M. N., Haddad, M., Zon, J., Navarro-Martin, L., Trudeau, V. L., & Mennigen, J. A. (2019). Developmental fluoxetine exposure in zebrafish reduces offspring basal cortisol concentration via life stage-dependent maternal transmission. *PLoS One*, 14(2), e0212577.
- Mason, R. T., Martin, J. M., Tan, H., Brand, J. A., Bertram, M. G., Tingley, R., Todd-Weckmann, A., & Wong, B. B. M. (2021). Context is key: social environment mediates the impacts of a psychoactive pollutant on shoaling behavior in fish. *Environmental Science & Technology*, 55, 13024-13032.
- Mathiesen, L., Buerki-Thurnherr, T., Pastuschek, J., Aengenheister, L., & Knudsen, L. E. (2021). Fetal exposure to environmental chemicals; insights from placental perfusion studies. *Placenta*, 106, 58-66.
- McCallum, E. S., Bose, A. P., Warriner, T. R., & Balshine, S. (2017). An evaluation of behavioural endpoints: the pharmaceutical pollutant fluoxetine decreases aggression across multiple contexts in round goby (*Neogobius melanostomus*). *Chemosphere*, 175, 401-410.

- McDonald, M. D., Gonzalez, A., & Sloman, K. A. (2011). Higher levels of aggression are observed in socially dominant toadfish treated with the selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(1), 107-112.
- McDonald, M. D. (2017). An AOP analysis of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 197, 19-31.
- Meijide, F. J., Da Cuña, R. H., Prieto, J. P., Dorelle, L. S., Babay, P. A., & Nostro, F. L. L. (2018). Effects of waterborne exposure to the antidepressant fluoxetine on swimming, shoaling and anxiety behaviours of the mosquitofish *Gambusia holbrooki*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 646-655.
- Melvin, S. D., & Wilson, S. P. (2013). The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. *Chemosphere*, 93(10), 2217-2223.
- Melvin, S. D. (2017). Effect of antidepressants on circadian rhythms in fish: insights and implications regarding the design of behavioural toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, 182, 20-30.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., Dos Santos Afonso, M., & Salibián, A. (2012). Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 6-9.
- Mennigen, J. A., Harris, E. A., Chang, J. P., Moon, T. W., & Trudeau, V. L. (2009). Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain. *Regulatory Peptides*, 155, 99-104.
- Mennigen, J. A., Sassine, J., Trudeau, V. L., Moon, T. W. (2010a). Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, 100, 128-137.
- Mennigen, J. A., Lado, W. E., Zamora, J. M., Duarte-Guterman, P., Langlois, V. S., Metcalfe, C. D., Chang, C. D., Moon, T. W., & Trudeau, V. L. (2010b). Waterborne fluoxetine disrupts the reproductive axis in sexually mature male goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, 100(4), 354-364.
- Mennigen, J. A., Zamora, J. M., Chang, J. P., & Trudeau, V. L. (2017). Endocrine disrupting effects of waterborne fluoxetine exposure on the reproductive axis of female goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 202, 70-78.
- Metcalfe, C. D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K. D., Servos, M. R., & Andrews, D. M. (2010). Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(1), 79-89.

- Mezzelani, M., Gorbi, S., & Regoli, F. (2018). Pharmaceuticals in the aquatic environments: evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine Environmental Research*, 140, 41-60.
- Milea, D., Verpillat, P., Guelfucci, F., Toumi, M., & Lamure, M. (2010). Prescription patterns of antidepressants: findings from a US claims database. *Current Medical Research and Opinion*, 26(6), 1343-1353.
- Milla, S., Wang, N., Mandiki, S. N. M., & Kestemont, P. (2009). Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 153, 242-251.
- Miranda, J. P., Isaac, A. B. J., Silva, R. B., Toledo, L. C., Barcellos, L. J., Delicio, H. C., & Barreto, R. E. (2023). Acute Effects of Fluoxetine on Stress Responses and Feeding Motivation in Nile Tilapia. *Fishes*, 8(7), 348.
- Miyashita Y, Kumazawa, T, & Fujii, R. (1984). Receptor mechanisms in fish chromatophores. Adenosine receptors mediate pigment dispersion in guppy and catfish melanophores. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 77C, 205 -210.
- Mole, R. A., & Brooks, B. W. (2019). Global scanning of selective serotonin reuptake inhibitors: occurrence, wastewater treatment and hazards in aquatic systems. *Environmental Pollution*, 250, 1019-1031.
- Mommsen T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 211-268.
- Monteiro, D. A., Kalinin, A. L., Rantin, F. T., & McKenzie, D. J. (2021). Use of complex physiological traits as ecotoxicological biomarkers in tropical freshwater fishes. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 335(9-10), 745-760.
- Moreno-Pérez, P. A., Manzanares-Leal, G. L., Calderon, M. Á. K., Sánchez, Y. C., & Ramírez-Durán, N. (2023). Impact of emerging pollutants on a health triad: environment, animals and humans. *One Health Triad*, Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan, 1, 31-35.
- Naidu, R., Biswas, B., Willett, I. R., Cribb, J., Singh, B. K., Nathanail, C. P., ... & Aitken, R. J. (2021). Chemical pollution: A growing peril and potential catastrophic risk to humanity. *Environment International*, 156, 106616.
- Nesan, D., & Vijayan, M. M. (2013). Role of glucocorticoid in developmental programming: evidence from zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 181, 35-44.
- Niemi, L., Taggart, M., Boyd, K., Zhang, Z., Gaffney, P. P. J., Pflieger, S. & Gibb, S. (2020). Assessing hospital impact on pharmaceutical levels in a rural 'source-to-sink' water system. *Science of the Total Environment*, 737, 139618.

- Norrgren, L. (2012). Fish models for ecotoxicology. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), S14.
- Nowakowska, K., Giebułtowski, J., Kamaszewski, M., Adamski, A., Szudrowicz, H., Ostaszewska, T., ... & Drobniewska, A. (2020). Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: Bioaccumulation, physiological and histological changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 229, 108670.
- Nunes, B., Gaio, A. R., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 341-354.
- Ossana, N. A., Eissa, B. L., Baudou, F. G., Castañé, P. M., Soloneski, S., & Ferrari, L. (2016). Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133, 73-81.
- Ossana, N. A., Baudou, F. G., Castañé, P. M., Tripoli, L., Soloneski, S., & Ferrari, L. (2019). Histological, genotoxic, and biochemical effects on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842)(Cyprinodontiformes, Poeciliidae): early response bioassays to assess the impact of receiving waters. *Journal of Toxicology*, 2019(1), 4687685.
- Painter, M. M., Buerkley, M. A., Julius, M. L., Vajda, A. M., Norris, D. O., Barber, L. B., Furlong, E. T., Schultz, M. M., & Schoenfuss, H. L. (2009). Antidepressants at environmentally relevant concentrations affect predator avoidance behavior of larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 2677-2684.
- Pal, A., Gin, K. Y. H., Lin, A. Y. C., & Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment*, 408(24), 6062-6069.
- Pan, C., Yang, M., Xu, H., Xu, B., Jiang, L., & Wu, M. (2018). Tissue bioconcentration and effects of fluoxetine in zebrafish (*Danio rerio*) and red crucian carp (*Carassius auratus*) after short-term and long-term exposure. *Chemosphere*, 205, 8-14
- Paracampo, A., Solis, M., Bonetto, C., & Mugni, H. (2015). Acute toxicity of chlorpyrifos to the non-target organism *Cnesterodon decemmaculatus*. *International Journal of Environmental Health Research*, 25(1), 96-103.
- Parolini, M., Ghilardi, A., De Felice, B., & Del Giacco, L. (2019). Environmental concentration of fluoxetine disturbs larvae behavior and increases the defense response at molecular level in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 34943-34952.

- Patel, N., Khan, M. Z., Shahane, S., Rai, D., Chauhan, D. K., Kant, C., & Chaudhary, V. K. (2020). Emerging Pollutants in Aquatic Environment: Source, Effect, and Challenges in Biomonitoring and Bioremediation- A Review. *Pollution*, 6(1), 99-113.
- Pautasso, N. A. (2017). Evaluación del impacto de la exposición a mezclas de agroquímicos presentes en escorrentías de cultivos extensivos utilizando como biomarcadores el daño oxidativo y genotóxico en *Cnesterodon decemmaculatus*. Tesis de Maestría en Salud Ambiental. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Argentina.
- Pei, S., Liu, L., Zhong, Z., Wang, H., Lin, S., & Shang, J. (2016). Risk of prenatal depression and stress treatment: alteration on serotonin system of offspring through exposure to Fluoxetine. *Scientific Reports*, 6(1), 33822.
- Pelli, M., & Connaughton, V. P. (2015). Chronic exposure to environmentally-relevant concentrations of fluoxetine (Prozac) decreases survival, increases abnormal behaviors, and delays predator escape responses in guppies. *Chemosphere*, 139, 202–209.
- Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera, E., Alvarez, J., & Rodriguez-Pinzón, M. (2019). Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal of Environmental Management*, 237, 408-423.
- Persson, L., Carney Almroth, B. M., Collins, C. D., Cornell, S., De Wit, C. A., Diamond, M. L., ... & Hauschild, M. Z. (2022). Outside the safe operating space of the planetary boundary for novel entities. *Environmental Science and Technology*, 56(3), 1510-1521.
- Perreault, H. A., Semsar, K., & Godwin, J. (2003). Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiology & Behavior*, 79(4-5), 719-724.
- Peterson, E. K., Buchwalter, D. B., Kerby, J. L., LeFauve, M. K., Varian-Ramos, C. W., & Swaddle, J. P. (2017). Integrative behavioral ecotoxicology: bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and conservation. *Current Zoology*, 63(2), 185-194.
- Petrunich-Rutherford, M. L. (2019). Chronic fluoxetine treatment of juvenile zebrafish (*Danio rerio*) does not elicit changes in basal cortisol levels and anxiety-like behavior in adulthood. *PeerJ* 2019, 7, e6407.
- Pires, A. P., Srivastava, D. S., & Farjalla, V. F. (2018). Is biodiversity able to buffer ecosystems from climate change? What we know and what we don't. *Bioscience*, 68(4), 273-280.
- Posit team (2024). RStudio: Integrated development environment for R. *Posit software, PBC*. Boston, Massachusetts.

- Pure Earth & Green Cross Switzerland. (2016). World's Worst Pollution Problems—The Toxics Beneath Our Feet. Pure Earth Blacksmith Institute & Green Cross. New York, Estados Unidos y Zurich, Suiza.
- Pyke, G. H. (2005). A review of the biology of *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15, 339-365.
- Pyke, G. H. (2008). Plague minnow or mosquito fish? A review of the biology and impacts of introduced *Gambusia* species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 39, 171-191.
- Radwan, E. K., Abdel Ghafar, H. H., Ibrahim, M. B. M., & Moursy, A. S. (2023). Recent trends in treatment technologies of emerging contaminants. *Environmental Quality Management*, 32(3), 7-25.
- Raleigh, M. J., McGuire, M. T., Brammer, G. L., Pollack D. B., & Yuwiler, A. (1991). Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys. *Brain Reserch*, 20, 559(2):181-90.
- Ramirez, A. J., Brain, R. A., Usenko, S., Mottaleb, M. A., O'Donnell, J. G., Stahl, L. L., ... & Chambliss, C. K. (2009). Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2587-2597.
- Rand-Weaver, M., Margiotta-Casaluci, L., Patel, A., Panter, G. H., Owen, S. F., Sumpter, J. P. (2013). The read-across hypothesis and environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Environmental Science and Technology*, 47, 12297-12304.
- Rauchenberger, M. (1989). Systematics and biogeography of the genus *Gambusia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *American Museum Novitates*, 2951, 1-74.
- R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Viena, Austria.
- Reeb, S. G. (2008). Aggression in fishes. <https://howfishbahave.ca>
- Richardson, S. D., & Kimura, S. Y. (2017). Emerging environmental contaminants: Challenges facing our next generation and potential engineering solutions. *Environmental Technology & Innovation*, 8, 40-56.
- Richardson, K., Steffen, W., Lucht, W., Bendtsen, J., Cornell, S. E., Donges, J. F., Druke, M., Fetzer, I., Bala, G.,, & Rockstrom, J. (2023). Earth beyond six of nine planetary boundaries. *Science Advances*, 9, eadh2458.
- Ringuelet, R. A., Arámburu, R. H., & Arámburu, R. H. (1967). Los peces de agua dulce de la República Argentina. Comisión de Investigación Científica, Provincia de Buenos Aires. La Plata, Argentina.

- Rockstrom, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, A., Stuart Chapin, F., Lamnn, E. F., Lenton, T. M., Scheffer, M.,, & Foley, J. A. (2009). A safe operating space for humanity. *Nature*, 461(24), 472-475.
- Rohonczy, J., O'Dwyer, K., Rochette, A., Robinson, S. A., & Forbes, M. R. (2021). Meta-analysis shows environmental contaminants elevate cortisol levels in teleost fish-Effect sizes depend on contaminant class and duration of experimental exposure. *Science of the Total Environment*, 800, 149402.
- Ruckman, S. N., Humphrey, E. A., Muzzey, L., Prantalou, I., Pleasants, M., & Hughes, K. A. (2024). A meta-analysis of the relationship between color and aggression. <https://doi.org/10.1101/2024.01.12.575404>.
- Saaristo, M., McLennan, A., Johnstone, C. P., Clarke, B. O., Wong, B. B. M. (2017). Impacts of the antidepressant fluoxetine on the anti-predator behaviours of wild guppies (*Poecilia reticulata*). *Aquatic Toxicology*, 183, 38-45.
- Sadoul, B., & Vijayan, M. M. (2016). Stress and growth. *Fish Physiology*, 35, 167-205.
- Sadoul, B., & Geffroy, B. (2019). Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *Journal of Fish Biology*, 94(4), 540-555.
- Safian, D., Wiegertjes, G. F., & Pollux, B. J. (2021). The fish family Poeciliidae as a model to study the evolution and diversification of regenerative capacity in vertebrates. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 613157.
- Salahinejad, A., Attaran, A., Meuthen, D., Chivers, D. P., & Niyogi, S. (2022). Proximate causes and ultimate effects of common antidepressants, fluoxetine and venlafaxine, on fish behavior. *Science of the Total Environment*, 807, 150846.
- Schmidt, B. J., & Jordan, L. M. (2000). The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Research Bulletin*, 53(5), 689-710.
- Schreck, C. B., & Tort, L. (2016). The concept of stress in fish. *Fish physiology*, 35, 1-34.
- Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Blazer, V. S., Norris, D. O., & Vajda, A. M. (2010). Antidepressant pharmaceuticals in two US effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environmental Science and Technology*, 44(6), 1918-1925.
- Schultz, M. M., Painter, M. M., Bartell, S. E., Logue, A., Furlong, E. T., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L. (2011). Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquatic Toxicology*, 104, 38-47.
- Scott, P. D., Coleman, H. M., Colville, A., Lim, R., Matthews, B., McDonald, J. A., ... & Leusch, F. D. (2017). Assessing the potential for trace organic contaminants commonly

- found in Australian rivers to induce vitellogenin in the native rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) and the introduced mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Aquatic Toxicology*, 185, 105-120.
- Sebire, M., Davis, J. E., Hatfield, R., Winberg, S., & Katsiadaki, I. (2015). Prozac affects stickleback nest quality without altering androgen, spiggin or aggression levels during a 21-day breeding test. *Aquatic Toxicology*, 168, 78-89.
 - Segner, H., & Baumann, L. (2016). What constitutes a model organism in ecotoxicology? *Integrated Environmental Assessment and Management*, 12(1), 199-200.
 - Sghendo, L., & Mifsud, J. (2012). Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(3), 317-325.
 - Silva, L. J., Lino, C. M., Meisel, L. M., & Pena, A. (2012). Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: an ecopharmacovigilance approach. *Science of the Total Environment*, 437, 185-195.
 - Soleman, S. R., Fujitani, T., Fujii, Y., & Harada, K. H. (2020). Levels of Octachlorostyrene in Mothers' Milk and Potential Exposure Among Infants in Sendai City, Japan 2012. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(9), 3064.
 - Srean, P. (2015). Understanding the ecological success of two worldwide fish invaders (*Gambusia holbrooki* and *Gambusia affinis*). Tesis de Doctorado en Ciencias Experimentales. Instituto de Ecología Acuática. Universidad de Girona. España.
 - Stahl, S. M. (1998). Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors: serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *Journal of Affective Disorders*, 51(3), 215-235.
 - Steffen, W.; Richardson, K.; Rockstrom, J.; Cornell, S. E.; Fetzer, I.; Bennett, E. M.; Biggs, R.; Carpenter, S. R.; de Vries, W.; de Wit, C. A.; Folke, C.; Gerten, D.; Heinke, J.; Mace, G. M.; Persson, L. M.; Ramanathan, V.; Reyers, B.; & Sorlin, S. (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science*, 347, 1259855.
 - Sumpter, J. P., Donnachie, R. L., & Johnson, A. C. (2014). The apparently very variable potency of the anti-depressant fluoxetine. *Aquatic Toxicology*, 151, 57-60.
 - Sumpter, J. P., Runnalls, T. J., Johnson, A. C., & Barcelo, D. (2023). A 'Limitations' section should be mandatory in all scientific papers. *Science of The Total Environment*, 857, 159395.
 - Sylvester, F., Weichert, F. G., Lozano, V. L., Groh, K. J., Bálint, M., Baumann, L., ... & Hollert, H. (2023). Better integration of chemical pollution research will further our understanding of biodiversity loss. *Nature Ecology & Evolution*, 7(10), 1552-1555.

- Tang, Y., Yin, M., Yang, W., Li, H., Zhong, Y., Mo, L., ... & Sun, X. (2019). Emerging pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, and risk assessment. *Water Environment Research*, 91(10), 984-991.
- Theodoridi, A., Tsalafouta, A., & Pavlidis, M. (2017). Acute exposure to fluoxetine alters aggressive behavior of zebrafish and expression of genes involved in serotonergic system regulation. *Frontiers in neuroscience*, 11, 223.
- Thompson, L. A., & Darwish, W. S. (2019). Environmental chemical contaminants in food: review of a global problem. *Journal of toxicology*, 2019(1), 2345283.
- Thoré, E.S., Philippe, C., Brendonck, L., & Pinceel, T. (2020). Antidepressant exposure reduces body size, increases fecundity and alters social behavior in the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*. *Environmetal Pollution*, 265, 115068.
- Thoré, E. S., Philippe, C., Brendonck, L., & Pinceel, T. (2021). Towards improved fish tests in ecotoxicology-efficient chronic and multi-generational testing with the killifish *Nothobranchius furzeri*. *Chemosphere*, 273, 129697.
- Thresher, R. E., Canning, M., & Bax, N. J. (2013). Demographic effects on the use of genetic options for the control of mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Ecological applications*, 23(4), 801-814.
- Toft, G., Edwards, T. M., Baatrup, E., & Guillette Jr, L. J. (2003). Disturbed sexual characteristics in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a lake contaminated with endocrine disruptors. *Environmental Health Perspectives*, 111(5), 695-701.
- Ueda, R, Ansai, S., & Takehuchi, H. (2024). Rapid body colouration change in *Oryzias celebensis* as a social signal for intraspecific competition. <https://doi.org/10.1101/2023.12.23.573172>
- UNEP (2019). UNEP's Global Chemicals Outlook II. From Legacies to Innovative Solutions. UN Environment Program. Nairobi, Kenya.
- Vasilachi, I. C., Asiminicesei, D. M., Fertu, D. I., & Gavrilescu, M. (2021). Occurrence and fate of emerging pollutants in water environment and options for their removal. *Water*, 13(2), 181.
- Vera-Candioti, J., Soloneski, S. & Larramendy, M. L. (2014) Chlorpyrifos-based insecticides induced genotoxic and cytotoxic effects in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Environmental Toxicology*, 29(12), 1390-1398.
- Vera-Chang, M. N., St-Jacques, A. D., Gagné, R., Martyniuk, C. J., Yauk, C. L., Moon, T. W., & Trudeau, V. L. (2018). Transgenerational hypocortisolism and behavioral disruption are induced by the antidepressant fluoxetine in male zebrafish *Danio rerio*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 115 (52), E12435-E12442.

- Vera-Chang, M. N., St-Jacques, A. D., Lu, C., Moon, T. W., & Trudeau, V. L. (2019). Fluoxetine exposure during sexual development disrupts the stress axis and results in sex-and time-dependent effects on the exploratory behavior in adult zebrafish *Danio rerio*. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1015.
- Vidal, N., Loureiro, M., Hued, A. C., Eguren, G., & de Mello, F. T. (2018). Female masculinization and reproductive success in *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Cyprinodontiforme: Poeciliidae) under anthropogenic impact. *Ecotoxicology*, 27(10), 1331-1340.
- Vidal, O., García-Berthou, E., Tedesco, P. A., & García-Marín, J. L. (2010). Origin and genetic diversity of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) introduced to Europe. *Biological Invasions*, 12, 841-851.
- Wang, Z., Walker, G. W., Muir, D. C., & Nagatani-Yoshida, K. (2020). Toward a global understanding of chemical pollution: a first comprehensive analysis of national and regional chemical inventories. *Environmental science & technology*, 54(5), pp.2575-2584.
- Ward, A. J. W., Webster, M. M., & Hart, P. J. B. (2006). Intraspecific food competition in fishes. *Fish and Fisheries*, 7(4), 231-261.
- Weinberger II, J., & Klaper, R. (2014). Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquatic Toxicology*, 151, 77-83.
- Westenberg, H. G. (2009). Recent advances in understanding and treating social anxiety disorder. *CNS spectrums*, 14(S3), 24-33.
- Wiles, S. C., Bertram, M. G., Martin, J. M., Tan, H., Lehtonen, T. K., & Wong, B. B. (2020). Longterm pharmaceutical contamination and temperature stress disrupt fish behavior. *Environmental Science and Technology*, 54 (13), 8072-8082.
- Wilkinson, J. L., Hooda, P. S., Barker, J., Barton, S., & Swinden, J. (2016). Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products, and other emerging contaminants: A review of environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(4), 336-381.
- Wilkinson, J. L., Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Leung, K. M. Y., Lai, R. W. S.... & Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(8), e2113947119.
- Wilson, A. D., Godin, J. G. J., & Ward, A. J. (2010). Boldness and reproductive fitness correlates in the eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Ethology*, 116(1), 96-104.
- Winberg, S., & Nilsson, G. E. (1993). Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative*

Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 106(3), 597-614.

- Winberg, S., Nilsson, A., Hylland, P., Söderström, V., Nilsson, G. E. (1997). Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neuroscience Letters*, 230(2), 113-116.
- Winberg, S., & Thörnqvist, P. O. (2016). Role of brain serotonin in modulating fish behavior. *Current Zoology*, 62, 317-323.
- Winder, V. L., Pennington, P. L., Hurd, M. W., & Wirth, E. F. (2012). Fluoxetine effects on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) locomotor activity. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47(1), 51-58.
- Wolkers, C. P., Serra, M., Barbosa Junior, A., Urbinati, E. C. (2017). Acute fluoxetine treatment increases aggressiveness in juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 43, 755-759.
- Yamindago, A., Lee, N., Lee, N., Jo, Y., Woo, S., & Yum, S. (2021). Fluoxetine in the environment may interfere with the neurotransmission or endocrine systems of aquatic animals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 227, 112931.
- Yan, Z., Zhang, X., Bao, X., Ling, X., Yang, H., Liu, J., Lu, G., & Ji, Y. (2020). Influence of dissolved organic matter on the accumulation, metabolite production and multi-biological effects of environmentally relevant fluoxetine in crucian carp (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*, 226, 105581.
- Yuan, M., Faggio, C., Perugini, M., Aliko, V., & Wang, Y. (2023). Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals: The physiological consequences of exposure to pollutants in aquatic animals. *Frontiers in Physiology*, 14, 1145052.
- Zambrano, M. J., Rautenberg, G. E., Bonifacio, A. F., Filippi, I., Amé, M. V., Bonansea, R. I., & Hued, A. C. (2018). Effects of water quality on aspects of reproductive biology of *Cnesterodon decemmaculatus*. *Science of the Total Environment*, 15, 10-21.
- Zhang, W., & Grillner, S. (2000). The spinal 5-HT system contributes to the generation of fictive locomotion in lamprey. *Brain Research*, 879, 188-192.
- Zhang, H., Shen, N., Li, Y., Hu, C., & Yuan, P. (2023). Source, transport, and toxicity of emerging contaminants in aquatic environments: A review on recent studies. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(58), 121420-121437.
- Zhou, Y., Meng, J., Zhang, M., Chen, S., He, B., Zhao, H., ... & Wang, T. (2019). Which type of pollutants need to be controlled with priority in wastewater treatment plants: traditional or emerging pollutants? *Environment International*, 131, 104982.