



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Química

Programa de
Doctorado en Ciencias Químicas

Protocolo de investigación

“Evaluación de la toxicidad inducida por fluoxetina sobre embriones y adultos de *Danio rerio*”

Presenta

M.CQ. José Manuel Orozco Hernández

Toluca, Estado de México

Noviembre del 2020

Tutor académico: Dr Leobardo Manuel Gómez Olivan

Contenido

RESUMEN	1
ANTECEDENTES.....	3
1.0 Agua	3
1.1. Contaminación	3
1.2. Contaminación del agua.....	3
1.3. Contaminantes emergentes	4
1.4. Contaminación de agua por productos farmacéuticos.....	5
1.5. Estructura y propiedades fisicoquímicas.....	7
1.6. Fuentes de contaminación	9
1.7. Mezclas complejas que favorecen toxicidad por interacciones.....	10
1.8. Fluoxetina (FLX).....	10
1.8.1. Propiedades farmacodinámicas:	10
1.8.2. Propiedades farmacocinéticas:	11
1.8.3. Vías de entrada al ambiente.....	11
1.8.4. Ocurrencia en el ambiente	12
1.8.5. Toxicidad de los ISRS en organismos acuáticos	12
1.9. Estrés oxidativo	13
1.10. Estrés oxidativo implicado en las alteraciones al desarrollo embrionario y teratogénesis	14
1.11. El pez cebrá (Danio rerio) como modelo bioindicador.....	16
2.0 JUSTIFICACIÓN.....	17
3.0 HIPÓTESIS.....	18
4.0 OBJETIVOS.....	18
5.0. METODOLOGÍA PARA EMBRIONES DE <i>D. RERIO</i>	19
6.8. 5.1. Mantenimiento de los organismos de prueba y obtención de los ovocitos.....	19
6.9. 5.1.2 Exposición de ovocitos	19
5.1.3 Embrioletalidad	20
5.1.4 Cálculo de CL50 / EC50 malformaciones y índice teratogénico (TI).....	20
5.1.5 Evaluación de las alteraciones del desarrollo embrionario y de los efectos teratogénicos.....	20
6.10.	21
5.1.6 Evaluación del estrés oxidativo.....	21
5.1.7 Estrés oxidativo inducido por fluoxetina	21
5.1.8 Evaluación del grado de lipoperoxidación (Método de Buege y Aust, 1979)	21

5.1.9	Evaluación del contenido de hidroperóxidos (Método Jiang et al., 1992)	22
5.1.10	Evaluación del contenido de proteínas carboniladas (Método de Levine et al., 1994; Parvez y Raisuddin, 2005; Burchman, 2007)	22
5.1.11	Evaluación de la actividad del superóxido dismutasa (Método de Misra y Fridovich, 1972)	22
5.1.12	Evaluación de la actividad de la catalasa (Método de Radi et al., 1991)	23
5.1.13	Evaluación de la actividad del glutatión peroxidasa (Método de Günzler y Flohé, 1985, modificado por Stephenson, 2000)	23
5.1.14	Determinación de proteínas totales (Método de Bradford; 1976)	23
5.1.15	Índice integrado de respuesta a los biomarcadores (IBRv2)	24
5.1.16	Aprobación ética	24
5.1.17	Criterio de validez de la prueba y análisis estadístico	24
5.2	RESULTADOS DE LA PRIMERA PARTE EXPERIMENTAL EN EMBRIONES DE <i>DANIO RERIO</i>	25
6.11.	5.2.1 Evaluación del desarrollo embrionario debido a la exposición a FLX	25
6.12.	5.2.1 Alteraciones del desarrollo embrionario y efectos teratogénicos inducidos por la exposición a FLX	26
6.13.	26
6.14.	5.2.4 Daño oxidativo inducido por FLX	26
6.15.	5.2.5. Índice de respuesta integral del biomarcador (IBRv2)	27
6.16.	5.2.6. Resultados y Discusión primera parte	27
6.17.	5.3 DISCUSIÓN PRIMERA PARTE	38
6.18.	5.3.1 DISCUSION	38
6.0.	METODOLOGÍA PARA ADULTOS DE <i>D. RERIO</i> (segunda parte experimental) ...	42
6.1.	Obtención y aclimatación del pez cebra	42
6.2.	Novel Tank Test	43
6.3.	Eutanasia y disección	43
6.4.	Determinación de los biomarcadores de estrés oxidativo	44
6.5.	Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa	44
6.6	RESULTADOS DE LA SEGUNDA PARTE EXPERIMENTAL EN ADULTOS DE <i>DANIO RERIO</i>	45
6.6.	Graficas de comportamiento	45
6.19.	Graficas de estrés oxidativo	45
6.20.	Tabla de la actividad de la acetilcolinesterasa	46
6.21.	Correlación de Pearson entre los biomarcadores de daño oxidativo y biomarcadores de neurotoxicidad	46
6.22.	Resultados y Discusión segunda parte	47

6.23.	Discusión	51
6.24.	Conclusiones	56
7.0	Bibliografía	57

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Estructura de antidepresivos ISRS	
2	Propiedades fisicoquímicas de los ISRS	
3	Ocurrencia de FLX en el ambiente	
4	Tabla de malformaciones dependiente de la concentración	
5	Actividad de acetilcolinesterasa	

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Vías de entrada de los contaminantes	
2	Porcentaje de organismos normales, muertos y teratogenicos	
3	Curvas de concentración-respuesta de FLX en embriones de <i>D. rerio</i>	
4	Malformaciones más graves y frecuentes inducidas por la exposición a FLX a concentraciones ambientalmente relevantes	
5	Biomarcadores de Actividad antioxidante: SOD, CAT y GPX	
6	Biomarcadores de oxidación celular: LPX, POX, HPX	
7	Indice Integrado de biomarcadores (IBRv2)	
8	Cambios en el comportamiento del pez cebrá adulto <i>D. rerio</i>	
9	Biomarcadores de estrés oxidativo	
10	Correlación de pearson entre los biomarcadores de comportamiento, estrés oxidativo y actividad de acetilcolinesterasa.	

RESUMEN

Durante la última década, los contaminantes emergentes han sido frecuentemente detectados en aguas superficiales y de desecho a niveles de ng/L, µg/L hasta mg/L. Estos compuestos ingresan a los ambientes acuáticos a través de diferentes fuentes, como aguas residuales de tipo urbano-doméstico e industrial, de residuos de plantas tratadoras de agua, de efluentes hospitalarios, de actividades agrícolas y ganaderas, y de los tanques sépticos, que contienen un gran número de contaminantes orgánicos y emergentes que se encuentran a diferentes concentraciones en las aguas superficiales, cuyos criterios de calidad ambiental con base a una normativa establecida aún no se han podido especificar y las plantas de tratamiento convencionales no cuentan con la tecnología necesaria para removerlos de las aguas residuales por lo que no están diseñadas para eliminarlos al 100%, aunado a esto se ha reportado que este tipo de compuestos pueden sufrir transformaciones bióticas y abióticas generando metabolitos aún más peligrosos que los compuestos originales, motivo por el cual existe una preocupación por parte de los científicos y para las entidades ambientales reguladoras para encontrar métodos de remoción eficientes y la búsqueda de una posible regulación de estos.

En los últimos años ha recibido mayor atención por parte de investigadores los posibles mecanismos químicos y moleculares en el estrés oxidativo, el daño al ADN, la modificación de proteínas y la actividad enzimática, con énfasis en el sistema biológico químico y libre de células. Esto debido a la presencia de diversos contaminantes entre los que destacan la fluoxetina un inhibidor selectivo de recaptura de serotonina (ISRS). Estudios previos han reportado que es capaz de generar estrés oxidativo, afectando a biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Actualmente los estudios previos, no son suficientes acerca de sus efectos en procesos biológicos esenciales tales como: desarrollo, reproducción y crecimiento, o letalidad en los organismos expuestos. Consecuentemente, es significativo generar más estudios en diferentes bioindicadores para obtener evidencia científica sobre sus posibles efectos adversos a través del uso de diversos biomarcadores de efecto como el estrés oxidativo, definido como un desequilibrio entre la cantidad de especies reactivas y las antioxidantes cuando esto ocurre durante el desarrollo embrionario podría generar embriotoxicidad y teratogenicidad. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son importantes para el desarrollo embrionario, ya que participan en procesos como la apoptosis, la activación de factores de transcripción y la diferenciación celular. Consecuentemente puede generar efectos de genotoxicidad y citotoxicidad, alteraciones en el comportamiento de la especie expuesta.

Por lo que el objetivo de este estudio será evaluar las alteraciones al desarrollo embrionario y efectos teratogénicos inducidos por fluoxetina a concentraciones ambientalmente relevantes sobre pez cebra

(*Danio rerio*) a diferentes tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 h. Las alteraciones al desarrollo embrionario, y el potencial teratogénico se realizó a través de la concentración letal media (CL₅₀), la concentración efectiva media para malformaciones (CE₅₀), el índice teratogénico (IT), la concentración mínima para inhibir el crecimiento (CMIC) y las malformaciones (generales y específicas) de desarrollo. Posteriormente, evaluar el daño por exposición se realizó la determinación del estrés oxidativo mediante las pruebas: grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos, proteínas carboniladas, y la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa(CAT) y Glutation peroxidasa (GPX). Finalmente se evaluó la neurotoxicidad, a través de la prueba de Novel Tank Test, determinación de la actividad de acetilcolinesterasa (ACHE) y estrés oxidativo en cerebro de adultos de *Danio rerio*. La información obtenida permitió proponer estas pruebas como biomarcadores tempranos, confiables e innovadores del impacto ecológico de la fluoxetina, encontrada frecuentemente en los cuerpos de agua, debido al alto consumo y demanda de antidepresivos debido al confinamiento por la pandemia del COVID-19.

ANTECEDENTES

1.0 Agua

El agua es una sustancia natural fundamental en el planeta, es utilizada para procesos ambientales, sociales, industriales e indispensables para la vida humana. Este recurso representa el 75% de la superficie total, pero no toda está en condiciones óptimas para el consumo humano. El 97% es salada, y solo el 2.5% restante es dulce y está distribuida en ríos, lagos, arroyos, entre otros (CONAGUA, 2015; Hiriart, 2015; SAGAN, 2007).

Actualmente, la demanda de este recurso ha aumentado ya que se emplea en distintas actividades tales como: agricultura, minería, industria, doméstica, y hospitalaria. Sin embargo, su calidad se ha visto afectada por la presencia de diversos contaminantes que son derivados de causas naturales o geoquímicas o provocado por actividades antropogénicas. La introducción continua de contaminantes ha generado efectos adversos en los ecosistemas acuáticos, así como en la disponibilidad para su consumo humano (CONAGUA, 2015; Hiriart, 2015; SAGAN, 2007).

1.1. Contaminación

Desde hace décadas, compuestos químicos consumidos por parte de la población en agricultura e industria son vertidos de forma masiva a las aguas a través de la red domestica, industrial y hospitalaria. Este hecho, ha provocado que, actualmente, exista una preocupación social creciente hacia la presencia de este tipo de compuestos en el medio ambiente ya que sin ser concientes de ello, hay una exposición continua a esta clase de contaminantes. La necesidad de establecer el riesgo a la salud en los sitios contaminados ha hecho del monitoreo una herramienta indispensable para asi poder proponer una posible regulación de la descarga de contaminantes emergentes a los cuerpos de agua.

1.2. Contaminación del agua

En la actualidad los niveles de contaminación en los cuerpos de agua se han ido incrementando de manera exponencial debido a las actividades domesticas-industriales y representa un problema ecotoxicologico para las sociedades del mundo (Alloway & Ayres, 1993). La contaminación es la adición de cualquier sustancia al agua en cantidad suficiente para producir daño a la flora y fauna, debido a causas naturales o actividades antropogénicas (SAGAN, 2015). Recientemente estas actividades de carácter antropogenico han hido en aumento en las últimas décadas, y como

consecuencia una amplia variedad de contaminantes presentes en las aguas residuales, como los plaguicidas, hidrocarburos, detergentes, fármacos, productos de cuidado personal, entre otros.

1.3. Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes son aquellos compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medioambiente y sus posibles efectos han pasado de forma inadvertida por lo que se requiere de su estudio para evaluar todas las áreas que permitan reducir los efectos potenciales a la salud humana y del medioambiente. Una gran parte de estos compuestos no están todavía regulados y pueden provocar efectos tóxicos y nocivos en diferentes organismos vivos. Por esta razón las investigaciones han centrado sus estudios porque han sido detectados ampliamente y poseen el potencial de producir un impacto ecológico (Barcelo & Lopez, 2007).

Los contaminantes emergentes incluyen una gran variedad de productos de uso cotidiano con aplicaciones tanto domésticas como industriales. Algunos ejemplos, basados en intensas investigaciones llevadas a cabo en los últimos años en cuanto a su presencia, impacto y tratamiento, han sido incluidos en la lista de sustancias prioritarias por la EPA y algunos pueden ser candidatos a una regulación futura debido al peligro que radican en diferentes aspectos (Petrovic *et al.*, 2003):

- Su producción y consumo que es de forma continua y en grandes cantidades, que tienen como destino los cuerpos de agua lo que origina que sean persistentes y bioacumulables, hasta alcanzar concentraciones importantes en los mismos y puedan alterar el equilibrio ecológico.
- Pueden presentar efectos tóxicos en organismos acuáticos o especies de importancia económica.
- Su presencia en el medio ambiente puede provocar efecto de bioacumulación en los organismos acuáticos y especies bioindicadoras.
- Las plantas tratadoras de aguas residuales no disponen de métodos de remoción que permitan la eliminación completa de estos compuestos. Por lo que su presencia en pequeñas cantidades es un problema ya que, estas aguas son reutilizadas para riego o recarga de acuíferos.

Acorde a los estudios previos publicados recientemente, los tipos de contaminantes emergentes que implican mayor atención (debido a la insuficiencia de datos ecotoxicológicos, ambientales, métodos para su análisis y las posibles consecuencias de su presencia en los ambientes acuáticos) se encuentran:

1. Los retardantes de flama

2. cloroalcanos
3. Los fármacos
4. Las drogas de abuso y sus metabolitos y/o productos de degradación
5. Microplásticos
6. Bloqueadores solares y detergentes industriales

1.4. Contaminación de agua por productos farmacéuticos

En las últimas décadas se ha prestado creciente atención a la incidencia de productos químicos farmacéuticos en los cuerpos de agua, ya que estas sustancias son capaces de inducir efectos negativos a las especies no acuáticas (Matozzo 2014 , Fabbri, 2015, San Juan Reyes *et al.*, 2015 , Luján-Mondragón *et al.*, 2019, Orozco-Hernández *et al.*, 2019).

Los productos farmacéuticos son compuestos complejos que han sido utilizados ampliamente porque tienen una actividad biológica ya sea para el tratamiento o la prevención de algunas enfermedades. Dentro de los productos farmacéuticos de mayor consumo a nivel mundial se encuentra a los antidepresivos.

La depresión representa uno de los trastornos psiquiátricos de mayor prevalencia entre la población que afecta aproximadamente a 121 millones de personas en todo el mundo, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) será la segunda causa en orden de importancia desde el punto de vista mundial para el año 2020. La depresión es una enfermedad unipolar que puede conducir al comportamiento suicida, en muchos casos. Entre 1960 y 1980, era tratada con antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO) y litio que se consideraban inocuos para la salud humana. Sin embargo estudios previos han reportado, efectos secundarios, información relevante sobre toxicidad y sus posibles interacciones farmacológicas de estos compuestos, en combinación con los avances del conocimiento del sistema nervioso central han llevado a la introducción de varios antidepresivos, los cuales actúan selectivamente como inhibidores de la noradrenalina y serotonina. Los antidepresivos de nueva generación, se conforman por los (Sarah *et al.*, 2005):

-  Inhibidores de la recaptación de la serotonina (SSRI), entre los que se encuentran la fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, paroxetina y citalopram.
-  Inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (NRI), entre los que se encuentran reboxetina, viloxazina y maprotilina.

-  Inhibidor selectivo de la serotonina y la recaptación de noradrenalina (IRSN): en esta familia se encuentra la venlafaxina.
-  Antidepresivos noradrenérgicos y serotoninérgicos específicos (NSSA): dentro de este grupo se encuentra mirtazapina y mianserina
-  Compuestos antagonistas de la serotonina e inhibidor de la recaptación, conocidos como SARI. En este grupo se encuentra la trazodona.

Los fármacos antidepresivos de forma breve y estructurada de psicoterapia son efectivos hasta en un 80% de los casos detectados en atención primaria. El antidepresivo clásico utilizado es la amitriptilina como fármaco de primera elección para el tratamiento de depresiones graves, a pesar de sus efectos secundarios como: ganancia de peso y somnolencia atribuidos a la acción antihistaminérgica sobre el receptor H1 de la amitriptilina; estreñimiento, déficit cognitivos, visión borrosa y un efecto terapéutico retardado. Hoy en día, el tratamiento farmacológico psiquiátrico se prescribe en numerosas combinaciones, donde hay mayor probabilidad de que se produzcan interacciones (antagonismo, sinergismo y potenciación) entre medicamentos (Sarah *et al.*,2005). Tanto el compuesto original como los metabolitos activos se deben cuantificar y determinar, ya que estos últimos contribuyen tanto al efecto terapéutico como al tóxico. La presencia de los productos de degradación proporciona información adicional sobre el momento de la ingestión y la capacidad metabólica (biotransformación) (Sarah *et al.*, 2007). Existen estudios en peces que permiten identificar y conocer la concentración, así como la distribución de fármacos como los antidepresivos entre los diferentes órganos (hígado, cerebro y músculo) (Lajeunesse *et al.*,2011).

Los fármacos de nueva generación han reducido algunos de los efectos secundarios y el riesgo de sobredosis, factores limitantes de la generación de antidepresivos y una de las principales causas de muerte en pacientes con desórdenes mentales como la depresión. Actualmente, su toxicidad no es del todo conocida por lo que se sugieren más estudios acerca de su toxicidad (Pietracci *et al.*,2013).

Sin embargo, existen compuestos que se suman a la alta demanda y consumo y dentro de esta clasificación encontramos: analgésicos, antibióticos, antiepilépticos, hormonas sintéticas y naturales, antidepresivos que han sido detectados en las diferentes vías de entrada al ambiente recientemente debido a la pandemia del COVID-19 (Lajeunesse *et al.*,2011).

1.5. Estructura y propiedades fisicoquímicas

Los antidepresivos SSRI son un grupo de compuestos con diferente composición química y potencial terapéutico. Ya que permiten el restablecimiento neuroquímico de pacientes con enfermedades psiquiátricas asociadas a la reducción de los niveles de serotonina en el espacio sináptico, a lo que se conoce comúnmente como depresión. Las estructuras de algunas de estas sustancias se muestran en la tabla 1.

ISRS	Molécula
Fluoxetina	 • HCl
Norfluoxetina	 • HCl
Sertralina	
Norsertralina	
Citalopram	
Desmetilcitalopram	

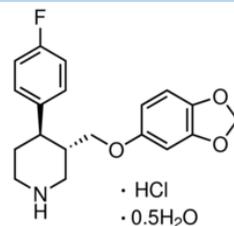
Paroxetina

Tabla 1. Estructura de los antidepresivos inhibidores de la recaptación de la serotonina (SSRIs) seleccionados: Fluoxetina (FLX), Norfluoxetina (NFLX), Sertralina (SER), Norsertalina (NSER), Citalopram (CIT), Desmetilcitalopram (DCIT) y Paroxetina (PAR).

Los SSRIs son aquellos cuyo mecanismo de acción se centra en la sinapsis serotoninérgicas, inhibiendo la recaptación de la 5-HT. Estos antidepresivos presentan una serie de ventajas frente a los IMAOs y antidepresivos tricíclicos. Que son estructuralmente distintos y presentan diferencias en relación a sus perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos. La sertralina y la paroxetina son los SSRIs de mayor potencial de inhibición de la recaptación de serotonina. En el caso del citalopram y la fluoxetina, son mezclas racémicas de formas quirales con diferentes perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos. En el caso de la fluoxetina que es administrada de forma oral, esta indicada para el tratamiento de trastornos como: ataque de pánico, obsesivo-compulsivo (TOC) y bulimia. Posteriormente es degradada de forma biótica o abiótica en su metabolito activo norfluoxetina, que es de acción prolongada y activo farmacológicamente. Por otro lado se pueden diferenciar en su tiempo de vida media y en su potencial para inhibir la isoenzima metabolizante del fármaco, citocromo P450 (CYP)³¹. Las propiedades físico-químicas de estos antidepresivos se resumen en la tabla 2.

Compuesto	Abv	CAS	Fórmula	Peso molecular g/mol	pka	Log KO W	LC50 (µg·mL ⁻¹)
Fluoxetina	FLX	56296-78-7	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO·HCl	345.79	10.1	4.65	0.7
Norfluoxetina	NFLX	57226-68-3	C ₁₆ H ₁₆ F ₃ NO·HCl	331.76	9.05	2.05	-
Sertralina	SER	79559-97-0	C ₁₇ H ₁₇ NCI ₂ ·HCl	342.69	9.48	2.18	0.12
Norsertalina	NSE R	91797-57-8	C ₁₆ H ₁₆ Cl ₃ N	328.66	-	-	-
Citalopram	CIT	59729-32-7	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O·HBr	405.30	9.5	3.74	3.9
Desmetilcitalopram	DCIT	114025-14-9	C ₁₉ H ₁₉ FN ₂ O·HCl	346.83	-	-	-

Paroxetina	PAR	110429 -35-1	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃ - HCl-H ₂ O	374.73	9.9	3.95	0.58
-------------------	-----	-----------------	--	--------	-----	------	------

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de SSRIs.

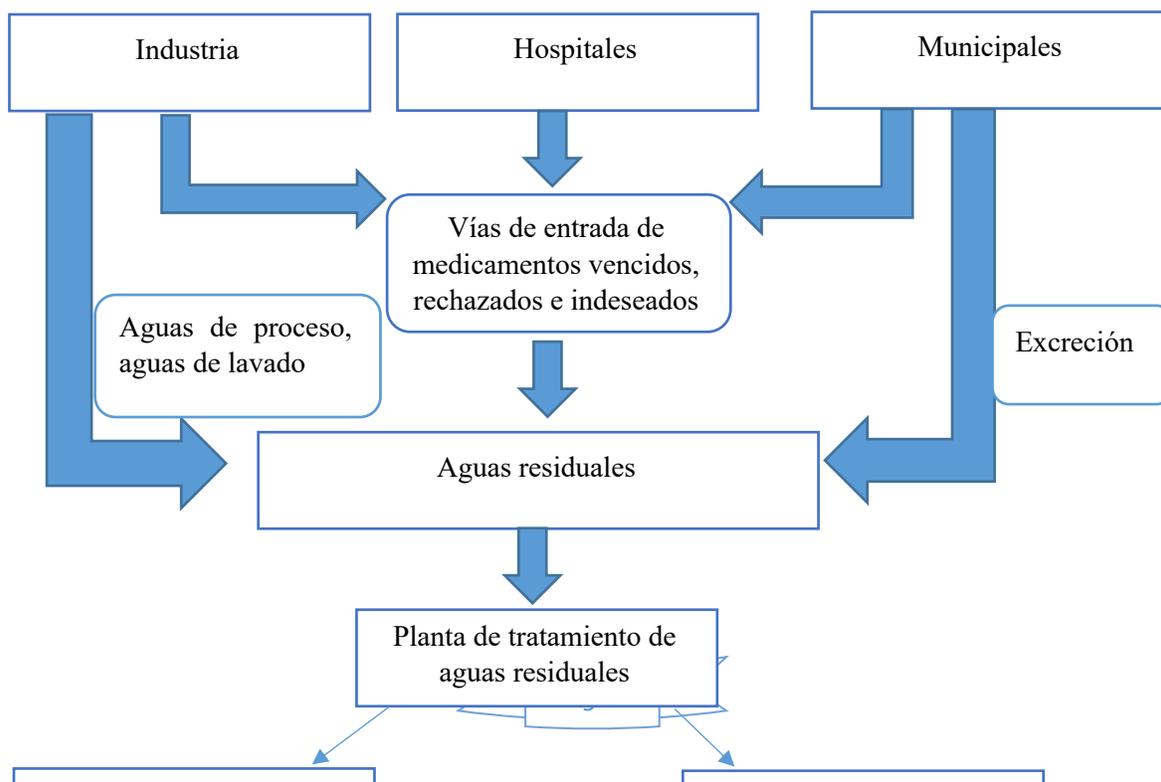
Fuente: Liliana J. G. Silva, André M.P.T. Pereira, Leonor M. Meisel, Celeste M. Lino, Angelina Pena. Reviewing the serotoning reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: Uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. *Environmental Pollution* (2015), 197.127-143.

1.6. Fuentes de contaminación

La presencia en el ambiente de un producto farmacéutico está en función de muchas variables, incluyendo la cantidad fabricada, dosis y frecuencia, la persistencia en el ambiente, el metabolismo del compuesto y la eficacia en su remoción por parte de las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Los productos farmacéuticos están diseñados para persistir y pueden tener una vida media larga en el ambiente, pueden acumularse, alcanzando niveles detectables y biológicamente activos. La persistencia en el ambiente se rige por la biodegradación, fotólisis por la luz solar y otras transformaciones abióticas, como la hidrólisis (Yamamoto *et al.*, 2009). En el ambiente, estos compuestos pueden ser transportados y distribuidos por diferentes vías.

La industria que ha generado una gran cantidad de aguas residuales con características y concentraciones variables de contaminantes emergentes, es la industria farmacéutica debido a la amplia gama de productos que se fabrican. Las principales fuentes de contaminación se describen en la figura 1.



1.7. Mezclas complejas que favorecen toxicidad por interacciones

Los tres mecanismos fundamentales que originan la interacción de los tóxicos son: 1) interacciones físicoquímicas (neutralización, inactivación, insolubilización o precipitación con anulación de su efecto por influencia en la absorción o formación de nuevas sustancias), 2) interacciones toxocinéticas (modificación de la concentración tisular de los tóxicos por interferencia en cualquiera de sus fases cinéticas) y 3) interacciones toxodinámicas (competencia entre los tóxicos por el sitio diana, alteración de la sensibilidad de éste o por la acción sobre distinto blanco, afectando el efecto de alguno de los tóxicos).

Existen cuatro tipos de interacciones que son:

- 1) Adición: Cuando el efecto producido por la combinación de dos o más xenobióticos, se define como la agregación de respuestas individuales esperadas. Por ejemplo, dos insecticidas organofosforados producen una inhibición aditiva de la acetilcolinesterasa.
- 2) Sinergismo: Cuando la exposición simultánea de dos agentes causa un drástico incremento en el efecto tóxico aún mayor que la suma de ambos. Por ejemplo, la exposición a asbesto y humo de cigarro resulta en un aumento significativo en el riesgo de contraer cáncer de pulmón.
- 3) Antagonismo: Cuando la exposición a uno de los xenobióticos resulta en una reducción en el efecto de otro. Por ejemplo, el zinc y el cadmio producen daño al ADN, sin embargo, cuando se encuentran en forma simultánea el daño se reduce hasta en un 49%.
- 4) Potenciación: se refiere a una sustancia que no es tóxica en un determinado órgano blanco, incrementa la toxicidad de otra que si lo es. Por ejemplo, el isopropanol no es hepatotóxico, pero al ser administrado con tetracloruro de carbono, incrementa el efecto de éste sobre el hígado (Peña *et al.* 2001).

1.8. Fluoxetina (FLX)

1.8.1. Propiedades farmacodinámicas:

La fluoxetina es un antidepresivo de segunda generación clasificado como inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS). Obtuvo la aprobación de la FDA en 1987 y, aunque inicialmente estaba destinado al tratamiento de la depresión, hoy en día se prescribe comúnmente para controlar trastorno obsesivo compulsivo, bulimia nerviosa. También se puede usar en combinación con olanzapina para tratar la depresión relacionada con el trastorno bipolar y la depresión resistente al tratamiento (Schenker *et al.*, 1988).

La fluoxetina bloquea el transportador de recaptación de serotonina en la terminal presináptica, lo que finalmente da como resultado niveles sostenidos de 5-hidroxitriptamina (5-HT) en ciertas áreas del cerebro. Se une con una afinidad relativamente baja a los receptores 5-HT, dopaminérgicos, adrenérgicos, colinérgicos, muscarínicos e histamínicos, lo que explica por qué tiene un perfil de efectos adversos mucho más deseable en comparación con las clases de antidepresivos tricíclicos (Liu *et al.*, 2002).

1.8.2. Propiedades farmacocinéticas:

La fluoxetina se solubiliza fácilmente en agua y se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal tras su administración oral alcanzándose niveles plasmáticos máximos al cabo de 4 a 8 horas. Tiene una vida media de 1 a 3 días y a niveles terapéuticos se une a proteínas plasmáticas en un 95%, ya que es muy lipofílica lo que permite que el fármaco y su metabolito activo, norfluoxetina, se distribuya al cerebro y sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Liu *et al.*, 2002).

La mayoría de los productos farmacéuticos se metabolizan en el hígado gracias a la familia de enzimas presentes como las citocromo p450 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 y CYP3A5). Aunque todas las enzimas mencionadas contribuyen a la N-desmetilación CYP2D6, CYP2C9 y CYP3A4 parecen ser las principales enzimas que contribuyen al metabolismo de fase I. Existe evidencia que sugiere que CYP2C19 y CYP3A4 median la O-desalquilación de fluoxetina y norfluoxetina para producir paratrilfluorometilfenol que posteriormente se metaboliza a ácido hipúrico. Tanto la fluoxetina como la norfluoxetina se someten a glucuronidación para facilitar su excreción. El fármaco como el metabolito activo inhiben las isoenzimas CYP2D6, por lo que los pacientes pueden ser susceptibles a las interacciones medicamentosas (Crifasi *et al.*, 1997; Margolis *et al.*, 2000).

Aproximadamente un 60-80% se excreta por la orina. Un 2.5% lo hace como molécula original y un 10% como norfluoxetina. Con la materia fecal se elimina entre un 12-15%. Con un tiempo de excreción para fluoxetina: 4-6 días, norfluoxetina: 4-16 días (Shi *et al.*, 2010).

1.8.3. Vías de entrada al ambiente

Las principales vías de entrada serían a través de efluentes hospitalarios, industriales y municipales y forman parte de las aguas residuales o entran directamente al ambiente, sin los tratamientos suficientes para su eliminación o remoción podrían tener como destino los cuerpos de agua y suelo principalmente.

La FLX es un compuesto bioacumulable en el ambiente, debido a su descarga continua. La cantidad de este compuesto que ingresa diariamente a las plantas de tratamiento municipal puede llegar al orden de nanogramos. microgramos, miligramos.

1.8.4. Ocurrencia en el ambiente

Fuente	Ubicación	Concentración (ng/L)	Referencia
Agua superficial (río)	España	0.6-66.1	Fernández <i>et al.</i> , 2010
Agua superficial	Polonia	3.2-5.5	Giebultowicz <i>et al.</i> , 2015
Agua superficial	Francia	1.0-2.0	González-Rey <i>et al.</i> , 2015
Efluente PTAR	Inglaterra	26.0	Evans <i>et al.</i> , 2015
Efluente PTAR	México	6.6-6.93	Estrada <i>et al.</i> , 2016
Influyente PTAR	México	2.9-4.41	Estrada <i>et al.</i> , 2016

Tabla 3. Ocurrencia de FLX en el ambiente.

1.8.5. Toxicidad de los ISRS en organismos acuáticos

Los ISRS son capaces de causar efectos adversos sobre procesos biológicos, aun cuando éstos en apariencia no estén asociados a su forma de acción en el cuerpo humano. Algunos autores se han enfocado en documentar principalmente el potencial de toxicidad aguda por medio de la letalidad (CL₅₀), inhibición (CI₅₀) u otros efectos agudos (CE₅₀) en bioindicadores modelo. Teniendo en cuenta que la liberación de los ISRS al ambiente es de manera continua y por periodos prolongados de exposición, se puede considerar que su riesgo de afectación puede ser crónico, condición que puede comprometer los procesos metabólicos en especies acuáticas no blanco (Brooks, *et al.*, 2003; Boxxal, *et al.*, 2003; Flaherty y Dodson, 2005; Neuwoehner, *et al.*, 2009; Lam, *et al.*, 2013; Weinberger, *et al.*, 2014) afectando de forma directa a la serotonina (5-HT) definida como uno de los neurotransmisores más importantes dentro del reino animal (Barry, 2013), que actúa como modulador directo de algunas funciones celulares (Mossner y Lesch, 1998; Kreke y Dietrich, 2008) y esencial en diversos procesos metabólicos de vertebrados e invertebrados (Foran, *et al.*, 2004), ya que regula el comportamiento, agresión, deseo sexual y es fundamental en el apetito y vigilia en vertebrados (Mennigen, *et al.*, 2011). Este neurotransmisor se produce en el sistema nervioso central (Styrishave, *et al.*, 2010), su mecanismo de acción es aún incierto en algunas especies. No obstante, se propone

que su modo de acción en peces es por medio de la alteración de los niveles de serotonina endógena, la cual interviene de manera directa en el proceso reproductivo por la afectación de hormonas relacionadas al comportamiento sexual (Menningen, *et al.*, 2011).

La variación de los niveles de serotonina en especies con receptores afines a la serotonina puede influir de forma directa sobre los procesos fisiológicos de las especies expuestas, incluidos aquellos derivados de la reproducción, desarrollo, comportamiento y sistema inmune (Park, *et al.*, 2012). Tanto fluoxetina como su metabolito activo (norfluoxetina) son los serotoninérgicos más investigados en relación a sus efectos sobre organismos no blanco (Bringolf, *et al.*, 2010; McDonald, *et al.*, 2011; Menningen, *et al.*, 2011). Existe evidencia científica que documenta respuestas de algunos organismos acuáticos con receptores afines a este neurotransmisor como es el caso de crustáceos y peces (Campos, *et al.*, 2012). *Ceriodaphnia dubia*, presentó variaciones en su tasa reproductiva promedio por exposición a fluoxetina, al disminuir el número total de neonatos por hembra a partir de concentraciones de 0.045 mg L⁻¹. En otro estudio, incremento la producción neonatal en el bioindicador *Daphnia magna* a concentraciones de 36 µg L⁻¹. Sin embargo, este aumento se vio afectado a concentraciones más altas (Flaherty y Dodson, 2005). Adicionalmente en otro estudio, se pudo observar durante el desarrollo reproductivo del pez *Danio rerio*, una menor producción de ovocitos a 0.32 µg L⁻¹ (Lister, *et al.*, 2009). Por otro lado, para el pez *Oryzias latipes* (pez medaka) Brooks y colaboradores (2003) reportaron la generación de malformaciones embrionarias tales como: afectaciones cardíacas (edema pericárdico), escoliosis y retraso del desarrollo corporal.

Estudios previos reportan que los ISRS disminuyen la respuesta al estrés oxidativo, sin embargo al inhibir enzimas de la familia de las citocromos p450, hacen a los organismos susceptibles a la exposición a otros fármacos que pueden inducir estrés oxidativo por un aumento de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

1.9. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como la exposición de organismos vivos a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio redox, ya sea por un déficit de defensas antioxidantes o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Puede generar daños a las biomoléculas como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Que se pueden expresar como alteraciones de la estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular; a esto se le conoce como mecanismo general de daño celular.(Rodríguez *et al.*, 2001; Ames *et al.*, 1993).

El estrés oxidativo está relacionado con la generación de enfermedades crónicas degenerativas como: cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, artritis reumatoide, isquemia, apnea obstructiva del sueño y otras enfermedades. Además, está relacionado con los mecanismos del envejecimiento, debido a un incremento progresivo en los procesos regulatorios mediados por los radicales libres que da como resultado cambios en la expresión de genes.

El daño genético se define con mayor precisión en términos de lesiones estructurales específicas que se producen a lo largo del ADN. Existen tres clasificaciones principales de los daños:

- a) La mutagénesis se refiere a mutaciones de un gen, que son cambios en la secuencia de ADN dentro de un gen.
- b) Clastogénesis refiere a los cambios en la estructura de los cromosomas, por lo general resulta en una ganancia, pérdida o reordenamiento de piezas cromosómicas
- c) Aneuploidía se refiere a la ganancia o pérdida de cromosomas intactos.

Las especies reactivas, como las de oxígeno (ROS) son importantes para el desarrollo embrionario, ya que participan en procesos como la apoptosis, la activación de factores de transcripción y la diferenciación celular. Pero cuando existe un desequilibrio entre la cantidad de especies reactivas y las antioxidantes se genera estrés oxidativo y cuando esto ocurre durante el desarrollo embrionario podría generar **embriotoxicidad y teratogenicidad** (Ali *et al.*, 2011). Principalmente si es estrés oxidativo es inducido por un exógeno, como son los fármacos, los metales pesados y los productos químicos encontrados en el efluente hospitalario.

La embriotoxicidad es la capacidad de una sustancia para producir efectos tóxicos en la progenie durante el desarrollo embrionario temprano (Rohwedel *et al.*, 2001), desde la concepción a la etapa fetal. Dichos efectos pueden incluir malformaciones que comprometen la vida de los organismos, alteraciones morfológicas que se pueden presentar durante el desarrollo y crecimiento, de funciones celulares y muerte celular programada (apoptosis). La teratogenesis se refiere a la alteración morfológica, bioquímica o funcional, que se presenta después del periodo de embriogénesis.

1.10. Estrés oxidativo implicado en las alteraciones al desarrollo embrionario y teratogénesis

La revisión de la literatura disponible indica que muchos fármacos aumentan las EROx en organismos acuáticos, y tal estrés puede estar relacionado con alteraciones del desarrollo, incluyendo efectos reproductivos, embriotoxicidad y/o teratogenicidad (Arellano-Aguilar *et al.*, 2013).

Cualquier factor externo que afecte a la proliferación, diferenciación o apoptosis celular puede producir efectos embriotóxicos o teratogénicos, y tales factores incluyen exposiciones químicas a

altas concentraciones; tales efectos pueden resultar en malformaciones congénitas permanentes, anomalías funcionales o incluso en la muerte del embrión. Varios factores externos pueden dar lugar a embriotoxicidad y teratogenicidad en el medio acuático. Estos factores incluyen la radiación ultravioleta, los cambios en el pH, las condiciones térmicas e iónicas, las infecciones, los parásitos, así como las sustancias químicas, tales como, los productos farmacéuticos, los retinoides, los compuestos aromáticos y los plaguicidas (Rohwedel *et al.*, 2001).

A pesar de la investigación intensiva, los mecanismos implicados en la teratogénesis todavía no se entienden suficientemente, pero se sabe que difieren entre varios compuestos. Sin embargo, se conocen los siguientes mecanismos mediante los cuales los xenobióticos pueden inducir efectos de desarrollo, e incluyen alteraciones del ADN (es decir, mutaciones, aberraciones cromosómicas o efectos del metabolismo de ácidos nucleicos), inhibición de enzimas específicas, alteraciones de membranas, modulación de los suministros de energía celular, así como la interrupción de la señalización del ácido retinoico o el EOX. A menudo, un conjunto complejo de factores y/o la acumulación de errores producen malformaciones morfológicas o letalidad embrionaria.

El oxígeno desempeña un papel clave en el metabolismo y es fundamental para las primeras etapas del desarrollo de los organismos. Se sabe que varios derivados del oxígeno, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO), tienen funciones de señalización y pueden afectar varios procesos fisiológicos y patológicos en un organismo. En el nivel de la embriogénesis, la regulación sensible de ERO se ha relacionado con el control de la escisión de ovocitos, así como la maduración de ovocitos, la esteroidogénesis ovárica, la ovulación, la implantación y la formación de blastocistos.

Sin embargo, los niveles de ERO deben ser controlados continuamente para evitar que se vuelvan altamente tóxicos a macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ADN y lípidos de membrana). El potencial teratogénico de los xenobióticos depende por tanto de las vías embrioprotectoras y de la desintoxicación y la reparación de macromoléculas. Recientemente se demostró que las defensas antioxidantes generales desempeñan un papel importante en la protección de las primeras etapas de las larvas acuáticas y en las fases de desarrollo posteriores, así como en el proceso de metamorfosis.

Para proteger contra las ERO, las células contienen moléculas antioxidantes no enzimáticas (el tripéptido glutatión, la vitamina E y las metalotioneínas) y enzimas que pueden desintoxicar ERO. Estas enzimas incluyen: la SOD que existe en las mitocondrias y el citosol, la CAT que cataliza la

eliminación del peróxido de hidrógeno en los peroxisomas, y la GPX presente en el núcleo, las mitocondrias y el citosol. Otras enzimas importantes que son conocidas por proteger el embrión contra las moléculas reactivas son la glutatión-S-transferasa (GST) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).

La importancia del EROx al causar embriotoxicidad o teratogenicidad también se confirmó indirectamente en estudios con mamíferos y humanos, en los que las adiciones externas de antioxidantes impidieron daños a los embriones.

Los radicales libres de ácidos poliinsaturados entre sí pueden formar dímeros por entrecruzamiento o pueden ciclarse, mediante la formación de nuevos agregados de bajo peso molecular como el MDA (Malondialdehído) que conducen a la disminución de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana, modificando su estructura y con ello la función de las células y de los tejidos. De manera indirecta el MDA puede reaccionar con otras moléculas como los aminoácidos y dañar a la célula (Konigsberg, 2008).

1.11. El pez cebra (*Danio rerio*) como modelo bioindicador **ME QUEDE AQUÍ PARA MODIFICAR EL TEXTO**

Los peces teleósteos son organismos con mayor uso en pruebas de biomonitoreo de cuerpos de agua debido a la sensibilidad que favorece el contacto con los contaminantes emergentes (Arellano-Aguilar *et al.*, 2013).

El pez cebra es un modelo de fácil manejo para el laboratorio que se emplea en el estudio de diversos aspectos biológicos como el desarrollo embrionario, fisiología y genómica. Aproximadamente el 71% del genoma del pez cebra es ortólogo con el ser humano, incluyendo 82% de genes asociados a enfermedades como el cáncer, Alzheimer, Parkinson y cardiopatías (Howe *et al.*, 2013).

El pez cebra ha surgido como un modelo vertebrado para estudios en genética, desarrollo embrionario y recientemente como modelo de biomonitoreo y toxicidad de sustancias químicas, particularmente por su sensibilidad y capacidad de respuesta (Rocha *et al.*, 2011).

Las principales ventajas que caracterizan el uso del pez cebra como modelo bioindicador se encuentran: organismo regulado por la OCDE para estudios de toxicidad aguda, elevada tasa reproductiva, ciclo de vida corto y desarrollo embrionario rápido, además de un corion transparente que permite la observación visual del desarrollo de cada órgano a través del tiempo. (Lawrence *et al.*, 2007).

El desarrollo embrionario del pez cebra se lleva a cabo en 72 horas post-fertilización; desde la fecundación hasta la eclosión de una larva. En 1995, Kimmell y colaboradores describieron detalladamente el proceso del desarrollo embrionario, distinguiendo siete periodos y treinta y nueve etapas morfológicas específicas. Los siete periodos del desarrollo corresponden a una serie de procesos de división, migración celular y señalización, común en vertebrados.

Durante las etapas de 12, 24, 48 y 72 hpf (horas post fertilización) es posible observar cambios morfológicos, que permiten hacer el seguimiento del desarrollo embrionario (Haffter *et al.*, 1996; Kimmell *et al.*, 1995).

2.0 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se presenta un mayor interés por parte de investigadores los posibles mecanismos químicos y moleculares en el estrés oxidativo, el daño al ADN, la modificación de proteínas y la actividad enzimática, con énfasis en el sistema biológico químico y libre de células. Esto debido a la presencia de diversos contaminantes entre los que destacan la fluoxetina clasificado como un ISRS que por sus siglas se denomina inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, la cual se encuentra implicada en el comportamiento de organismos vertebrados. Presentando además propiedades antidepressivas, con menores efectos secundarios. Estudios previos han reportado que es capaz de generar estrés oxidativo, afectando a biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

En la literatura se ha reportado que los ISRS son capaces de inhibir isoenzimas de la familia de las Citocromo p450, por lo que hace susceptibles a bioacumular, bioconcentrar otro tipo de contaminantes emergentes que aumenten la generación de EROx en organismos acuáticos, y tal estrés puede estar relacionado con alteraciones del desarrollo, incluyendo efectos reproductivos, embriotoxicidad y/o teratogenicidad, genotoxicidad, citotoxicidad y alteraciones en el

comportamiento por la presencia de ISRS que se han considerado como sustancias neurotóxicas ya que afectan principalmente al SNC.

Acorde a lo anterior los reportes toxicológicos y de riesgo ambiental son insuficientes sobre esta clase de contaminantes emergentes por lo que se sugiere realizar más estudios para obtener evidencia suficiente para desarrollar estrategias adecuadas para su tratamiento, remoción y control, tomando en cuenta valores de concentración que resulten inocuos en exposiciones crónicas para las especies bioindicadoras modelo.

La búsqueda de nuevos biomarcadores de efecto y el empleo de pruebas de exposición crónica son acciones fundamentales en la estimación del peligro asociado a la presencia de contaminantes emergentes, en especial de compuestos farmacéuticos como los ISRS, ya que los indicadores de daño oxidativo y neurotoxicidad se consideran métodos de referencia para evaluación toxicológica, sin embargo no logran generar evidencia suficiente sobre el riesgo ambiental de esta tipo de compuestos para los organismos acuáticos.

3.0 HIPÓTESIS

La fluoxetina será capaz de inducir alteraciones en el desarrollo embrionario y tener un efecto teratogénico e inducir neurotoxicidad en adultos de *Danio rerio*, debido al estrés oxidativo.

4.0 OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la toxicidad inducida por fluoxetina sobre embriones y adultos de *Danio rerio*.

Objetivos específicos:

- 1) Evaluar alteraciones al desarrollo embrionario y el potencial teratogénico inducido por fluoxetina sobre *Danio rerio*.
- 2) Evaluar el estrés oxidativo inducido por fluoxetina en etapas tempranas de *Danio rerio*.
- 3) Evaluar la neurotoxicidad y el estrés oxidativo en cerebro, inducido por fluoxetina sobre adultos de *Danio rerio*.

5.0. METODOLOGÍA PARA EMBRIONES DE *D. RERIO*

6.7.5.1. Mantenimiento de los organismos de prueba y obtención de los ovocitos

Se utilizaron ejemplares de pez cebra (*Danio rerio*) adultos, los cuales se obtuvieron comercialmente. Los organismos se mantuvieron en peceras de vidrio de 160 L de capacidad durante 30 días, a temperatura ambiente, con periodos de luz/oscuridad natural y alimentados con TetraMin^{MR} para peces (aclimatación). Posteriormente al periodo de aclimatación, los peces fueron separados por género y colocados en tanques de 40 L. Los organismos se mantuvieron en agua a 28 ± 1 °C, pH 7-8, con ciclos de luz y oscuridad de 12-12 h. Fueron alimentados con hojuelas secas (TetraMin PRO) tres veces al día. Una vez al día también se les alimentó con larvas de Artemia salina para promover la ovoposición (Prueba n.º 236: Prueba de toxicidad aguda de los embriones de peces (FET), 2013).

Se emplearon ovocitos de *Danio rerio* obtenidos por fertilización natural. El proceso de fertilización se realizó in situ en el acuario de la Facultad de Química UAEMex. Para este proceso se colocaron 5 hembras y 10 machos adultos en etapa reproductiva fueron colocados dentro de una pecera de fertilización de 10 L. Se le colocaron filtros y difusores de aire. Las peceras fueron mantenidas en un acuario cerrado, a temperatura controlada de 28 ± 1 °C y fotoperiodos naturales de luz/oscuridad. Los ovocitos se obtuvieron mediante reproducción natural en el laboratorio, se seleccionaron (con ayuda de un microscopio estereoscópico) en la etapa de blástula a las 2h, para el estudio de las alteraciones al desarrollo embrionario y teratogénesis fueron expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de fluoxetina (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 ng L⁻¹).

6.8.5.1.2 Exposición de ovocitos

Estas pruebas se realizaron siguiendo las directivas establecidas por la OCDE, en su guía de prueba N° 236: Toxicidad aguda de embriones de peces (FET) Test (2013), para la especie *Danio rerio*. Para las pruebas, se utilizaron concentraciones ambientalmente relevantes de fluoxetina. Estas fueron

seleccionadas a base de estudios previos. En cada uno de los sistemas de exposición se colocaron ovocitos fertilizados seleccionados al azar, los cuales fueron colocados en microplacas de 24 pocillos. Se colocó un ovocito en cada pozo, las microplacas se mantuvieron durante 5 días a 28 ± 1 °C y periodos de luz-oscuridad natural en el laboratorio de toxicología de la Universidad Autónoma del Estado de México. La evaluación morfológica de los embriones se realizó a las 12, 24, 48, 72 y 96 h post-fertilización (hpf) de exposición utilizando un microscopio invertido y fue grabada con una cámara AxioCam 305 color y el programa Zen 2.3 lite (blue edition).

5.1.3 Embrioletalidad

Para la determinación de la (CL_{50}) de los sistemas anteriormente mencionados se observaron los ovocitos en el microscopio estereoscópico a las 96 h post-fertilización mencionadas y se cuantificaron los ovocitos coagulados. Los ovocitos muertos y vivos fueron contados. Se realizó un análisis de PROBIT con un del 95% de confianza para obtener la concentración letal media (CL_{50}).

5.1.4 Cálculo de CL_{50} / EC_{50} malformaciones y índice teratogénico (TI)

Para las determinaciones de CL_{50} / EC_{50} , se utilizará el método Karber (Hamilton *et al.*, 1977) empleando la USEPA software. El índice teratogénico de determinará a través del cociente de CL_{50} / EC_{50} de malformaciones. Si el TI de una sustancia es = 1, la sustancia se considerará teratogénica; si la sustancia es <1, la sustancia producirá efectos letales en el embrión (Weigt *et al.*, 2011).

5.1.5 Evaluación de las alteraciones del desarrollo embrionario y de los efectos teratogénicos

Las alteraciones en el desarrollo embrionario se registraron según el sistema de puntuación establecido por Kimmel *et al.*, (1995) y Hermsen *et al.*, (2011). Las alteraciones morfológicas de los embriones se identificaron utilizando un estereomicroscopio (Zeiss Stemi 305). Las alteraciones del desarrollo embrionario y los criterios de valoración de la teratogenicidad se evaluaron tomando en cuenta 1) el desarrollo de la cola, 2) la formación de somitas, 3) el desarrollo de los ojos, 4) el movimiento, 5) la circulación sanguínea, 6) los latidos del corazón, 7) la pigmentación de la cabeza y el cuerpo, 8) la pigmentación de la cola, 9) aparición de aleta pectoral, 10) protuberancia de la boca y 11) eclosión.

El total de malformaciones se expresó como el porcentaje de embriones con al menos una malformación o la malformación individual, respectivamente, en comparación con el control. Así

mismo se construyó una curva de concentración-respuesta con las principales malformaciones inducidas por la exposición al FLX en embriones de *D. rerio* utilizando IBM SPSS Statistics 22. Las imágenes de las malformaciones de los embriones fueron capturadas con una cámara digital Canon (EOS 80D). Se utilizaron para crear un histograma de frecuencias con las malformaciones presentes: retraso en el desarrollo, retraso en el proceso de eclosión, deformidad de la aleta, hipo pigmentación, hemorragia en la cabeza, hemorragia en la cola, hemorragia en el saco vitelino, estructura de la notocorda modificada, malformación de la cabeza, malformación del corazón, hiperplasia de la boca, malformación de los otolitos, malformación de la cola, edema pericárdico, raquisis, escoliosis, deformación del saco vitelino y edema de saco vitelino (yema).

6.9.

5.1.6 Evaluación del estrés oxidativo

5.1.7 Estrés oxidativo inducido por fluoxetina

Se pesó un gramo de ovocitos fecundados que fueron expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de fluoxetina (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 ng L⁻¹) en forma aislada, así como un grupo testigo. Después de 72 y 96 h de exposición, se realizó un homogenizado de los ovocitos en una solución buffer de fosfatos. Al homogenizado se le determinó la LPX (Jiang *et al.*, 1992), el HPC (Levine *et al.*, 1994), y el CPC (Parvez *et al.*, 2005; Burcham *et al.*, 2007); así como la actividad de las enzimas SOD (Misra *et al.*, 1972), CAT (Radi *et al.*, 1991) y GPX (Günzler y Flohé, 1985, modificado por Stephenson, 2000). El estudio se realizó por triplicado.

5.1.8 Evaluación del grado de lipoperoxidación (Método de Buege y Aust, 1979)

50µL de sobrenadante se reconstituyó con 450µL de solución tampón Tris HCl 150mM (pH 7.4) y 1mL de solución TCA-TBA (0,375% tiobarbitúrico, en ácido tricloroacético al 15%). Posteriormente esta solución se incubó a 37 ° C durante 30 min y la muestra se agitó en vortex, después se colocaron las muestras en un baño de agua hirviendo durante 45 min, y se enfriaron bruscamente para provocar un choque térmico. Seguido de esto las muestras se centrifugaron a 1077 G durante 10 min. Finalmente, la absorbancia se leyó a 535 nm usando una reacción de blanco. Los resultados obtenidos se expresarán como millimoles de malondialdehído por miligramo de proteína usando la extinción molar coeficiente de $1,56 \times 10^5$ M/cm.

5.1.9 Evaluación del contenido de hidroperóxidos (Método Jiang et al., 1992)

A 100 μ l de sobrenadante (deprotonizado con ácido tricloroacético al 10%) se le añadieron 900 μ l de mezcla de reacción (0.25mM FeSO₄, 25mM H₂SO₄, 0.1mM de naranja de xilenol y 4 mM 90% de butil hidroxitolueno en metanol). La mezcla se dejó reposar por 60 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Posteriormente se llevó a cabo la lectura de la absorbancia a 560nm, contra un blanco que contenía solo la mezcla de reacción. Los resultados se interpolaron en una curva tipo y el resultado se expresó en nanomoles de hidroperóxido de cumeno por miligramo de proteína.

5.1.10 Evaluación del contenido de proteínas carboniladas (Método de Levine et al., 1994; Parvez y Raisuddin, 2005; Burchman, 2007)

A 100 μ L del sobrenadante se le añadieron 150 μ L de 2,4-dinitrofenil hidrazina (10 mM en HCl 2 M), posteriormente se incubó la solución a temperatura ambiente durante 1 h en la oscuridad. Transcurrido el tiempo se añadieron 500 μ L de ácido tricloroacético (20%), y la muestra se dejó reposar durante 15 min a 4 ° C. Posteriormente se centrifugo a 14.475 G durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y el botón se lavó tres veces con 1mL de etanol: acetato de etilo (1:1). El precipitado se disolvió en 1mL de guanidina 6 M, pH 2.3, y se incubó a 37° C durante 30 min. Finalmente, la absorbancia se leyó a 366 nm, y los resultados se calcularon mediante el coeficiente de extinción molar de 21.000 M/ cm. Los datos se expresaron como nanomoles de carbonilos reactivos formados por miligramo de proteína.

5.1.11 Evaluación de la actividad del superóxido dismutasa (Método de Misra y Fridovich, 1972)

A 40 μ L de sobrenadante, se le añadieron 260 μ L de una solución buffer de carbonatos (carbonato de sodio 50 mM y 0.1 mM EDTA), a pH 10.2, y 200 μ L de adrenalina (30 mM) y se determinó la absorbancia a 480 nm, a los 30 s y 5 min. La actividad de SOD se determinó mediante la interpolación de los datos en una curva tipo. Los resultados se expresaron como SOD UL por miligramo de proteína.

5.1.12 Evaluación de la actividad de la catalasa (Método de Radi et al., 1991)

A 30 μL sobrenadante se le añadieron 420 μL de solución tampón de aislamiento (0.3 M de sacarosa, 1mM EDTA, 5 mM de HEPES “ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1- piperazinetanolsulfónico”, y 5 mM de KH_2PO_4) y 300 μL de solución de peróxido de hidrógeno (20 mM). Posteriormente se leyó la absorbancia a 240 nm, a los 0 y 60 s. Los resultados se expresaron como milimoles de H_2O_2 por miligramo de proteína.

5.1.13 Evaluación de la actividad del glutatión peroxidasa (Método de Günzler y Flohé, 1985, modificado por Stephenson, 2000)

Tome 100 μL de sobrenadante del tubo 2 y colocarlo directamente en la celda (preferentemente de cuarzo), adicione 290 μL de buffer de reacción, 100 μL de peróxido de hidrógeno 20mM y 12 μL de glutatión reductasa, leer la absorbancia a 340 nm utilizando un blanco de PBS que tenga el mismo tratamiento que las muestras.

5.1.14 Determinación de proteínas totales (Método de Bradford; 1976)

A 13 μL de sobrenadante se le añadieron 75 μL de agua destilada y 1.25mL del reactivo de Bradford, posteriormente se agitaron en el vórtex y se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Finalmente se leyó la absorbancia de la solución a 595nm. Los resultados obtenidos fueron empleados para referir los resultados obtenidos de los biomarcadores de oxidación y de antioxidación empleados en el estudio.

El experimento se realizó por triplicado en tres experimentos independientes. La reproducibilidad de los resultados se evaluó calculando la precisión de los mismos. La precisión se calculó utilizando la siguiente fórmula: $C.V. = \frac{s}{m} 100\%$. Donde: CV: coeficiente de variación, s: desviación estándar, m: media de las concentraciones.

5.1.15 Índice integrado de respuesta a los biomarcadores (IBRv2)

El índice de respuesta de biomarcadores integrado se empleó para analizar la influencia del estrés oxidativo inducido por el FLX en los embriones de *D. rerio* (Sánchez et al., 2013). Para la determinación del IBR, los biomarcadores de cada fármaco probado (X_i) se dividieron frente a los biomarcadores del grupo de control (X_o). La relación de X_i con X_o se transformó en logaritmo (Y_i) para reducir la varianza. A continuación, los valores de Y_i se armonizaron aplicando la fórmula $Z_i = (Y_i - m) / s$ y, utilizando la media (m) y la desviación estándar (s) de Y_i . Posteriormente, el índice de desviación del biomarcador (A) se estimó mediante la diferencia entre Z_i y Z_0 . Por último, los valores de A se trazaron en gráficos de estrella que representaban las respuestas integradas de los biomarcadores. Además, el valor absoluto de A de cada biomarcador se sumó para obtener el IBR.

5.1.16 Aprobación ética

Este protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) para garantizar que los experimentos se realicen de acuerdo con las normas institucionales para el cuidado de los animales (ID de aprobación: RP. UAEM.ERC.119.2020). Las disposiciones de la norma oficial mexicana sobre cría, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO1999).

5.1.17 Criterio de validez de la prueba y análisis estadístico

Para garantizar la trazabilidad de los resultados. Se utilizarán los lotes solo si la tasa de fertilización es $\geq 90\%$. También es importante mencionar que la prueba se considerará válida si los grupos de control no muestran un $>10\%$ de efectos teratogénicos letales a 96 hpf. Diseño estadístico y criterios de trazabilidad

La CL50 y la CE50 de malformaciones se calcularon con el software US-EPA ver 1.5, mediante un análisis probit con regresión lineal de máxima verosimilitud. El índice teratogénico (IT) se calculó mediante la relación entre la CL50 y la CE50 de malformaciones. Para la evaluación del desarrollo embrionario (escala de puntuación de Hermsen), se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls. Los datos de los biomarcadores de estrés oxidativo se examinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, considerando el tiempo como factor A y la concentración como factor B. Las variaciones entre las medias se examinaron con el

método de Student-Newman-Keuls, utilizando el software SigmaPlot 12.3. Todos los biomarcadores de estrés oxidativo superaron la prueba de normalidad.

5.2 RESULTADOS DE LA PRIMERA PARTE EXPERIMENTAL EN EMBRIONES DE *DANIO RERIO*

Nuestros resultados reportan un aumento en el número de embriones muertos y malformados de forma dependiente de la concentración. Se calcularon los valores LC50 y EC50m, que alcanzaron un valor de 30 ng L⁻¹ y 16 ng L⁻¹, respectivamente. Además, la FLX obtuvo un índice teratogénico de 1.9 y, en consecuencia, este fármaco debe clasificarse como teratogénico (Weigt et al., 2011). Para la determinación de la CL50 y la CE50, se realizó un análisis de regresión lineal. Nuestros valores de coeficiente de correlación, error estándar y grados de libertad fueron: 0.996, 1.71 y F (1.7) = 827,254, p < 0.05 respectivamente.

El porcentaje de embriones muertos aumenta de forma dependiente de la concentración, alcanzando su valor máximo (70%) a la concentración de 40 ng L⁻¹. En concordancia con lo anterior, el porcentaje de embriones normales disminuye de manera dependiente de la concentración, alcanzando su valor mínimo (11%) a la concentración de 40 ng L⁻¹. El porcentaje de embriones malformados se mantuvo relativamente constante de 20 ng L⁻¹ a 40 ng L⁻¹ de FLX (**Fig. 2**). No obstante, cabe destacar que a medida que aumentaba la concentración de este fármaco también aumentaba la severidad de las malformaciones (**Tabla 4**).

6.10. 5.2.1 Evaluación del desarrollo embrionario debido a la exposición a FLX

Las curvas de concentración-respuesta para cada concentración de FLX se muestran en la Fig. 3. Teniendo en cuenta los criterios de Hermsen et al. (2011) y Kimmel et al. (1995), no se observaron alteraciones del desarrollo embrionario en el grupo de control. A diferencia del grupo de control, FLX disminuyó significativamente la puntuación de los embriones en todos los grupos de tratamiento (p < 0.05). Esta disminución de la puntuación de los embriones se asocia a una mayor prevalencia de malformaciones en los embriones. Las principales malformaciones observadas en los embriones con menor puntuación fueron el edema pericárdico, alteraciones esqueléticas y malformaciones craneofaciales.

6.11. 5.2.1 Alteraciones del desarrollo embrionario y efectos teratogénicos inducidos por la exposición a FLX

La Tabla 4 muestra los efectos teratogénicos presentados en todas las concentraciones de FLX probadas y a diferentes tiempos de exposición. Como se puede observar a concentraciones de 30 a 40 ng L⁻¹ las malformaciones más graves y potencialmente mortales malformaciones incluían la malformación corporal, el retraso en la eclosión, edema pericárdico y malformación del saco vitelino. Aunque esta información no se ha comunicado en este trabajo, muchos de los embriones murieron a 100 hpf.

La Fig. 4 muestra las malformaciones más frecuentes y graves presentadas en los embriones expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de fluoxetina. Como puede verse, muchas de estas malformaciones ponen en riesgo la vida de los embriones, llevándolos a la muerte. Todas las malformaciones observadas en los embriones eran dependientes de la concentración y se representan como un histograma de frecuencias, en el que se indica la incidencia de malformaciones por concentración. El valor de control no se representa en el gráfico, ya que la incidencia de malformaciones fue nula. Las imágenes muestran que algunos de los embriones expuestos a las concentraciones más altas (30-40 ng L⁻¹) de FLX presentaron bifurcación de la cabeza.

5.2.3 Actividad antioxidante inducida por FLX

La actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX, en embriones de *D. rerio* expuestos a FLX, se representa en la **Fig. 5**. Como puede verse en esta figura, la actividad de todas las enzimas, en todos los grupos de exposición, mostró un aumento significativo en comparación con el grupo control. Además, a medida que aumentaba la concentración, la actividad de las enzimas también aumentaba, alcanzando el pico máximo a la concentración de 40 ng L⁻¹. Finalmente, a concentraciones de 10,15, 20, 25, 30, 35 y 40 ng L⁻¹ se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de CAT y GPX entre las 72 hpf.

6.12.

6.13. 5.2.4 Daño oxidativo inducido por FLX

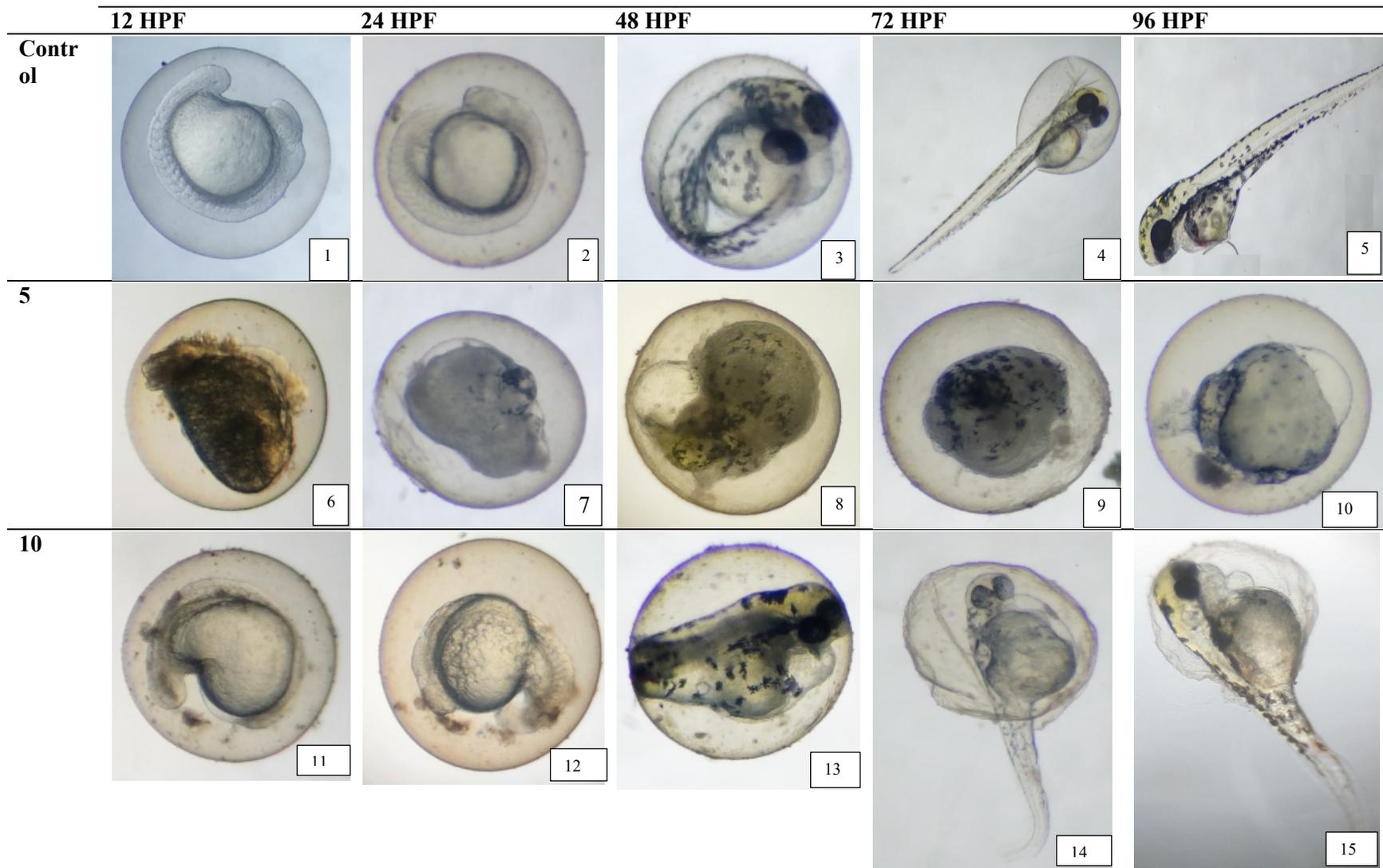
Los niveles de LPX, POX y HPX en embriones de *D. rerio* expuestos a FLX se muestran en la **Fig. 6**. Los niveles de todos los biomarcadores de daño oxidativo, en todos los grupos de tratamiento, mostraron un aumento significativo en relación con el grupo de control. Los niveles de todos los

biomarcadores de daño oxidativo aumentaron a medida que lo hizo la concentración, alcanzando su valor máximo a una dosis de 40 ng L⁻¹ de FLX. En cuanto a la LPX, se observó una diferencia significativa para todas las concentraciones entre los tiempos 72 y 96 hpf. Además, en el caso de HPX, se observó una diferencia significativa para las concentraciones 20, 25, 30, 35 y 40 ng L⁻¹ entre las 96 hpf y las 72 hpf. Dado que el C.V. alcanzó un valor de <10%, podemos decir que los resultados muestran una buena reproducibilidad. Este valor fue consistente en ambos experimentos.

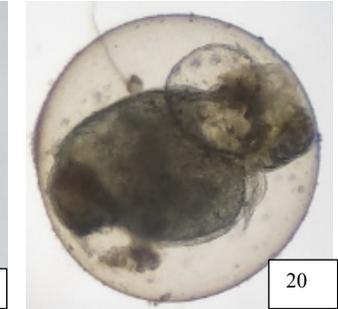
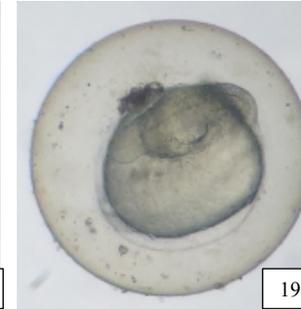
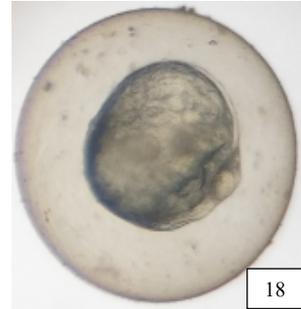
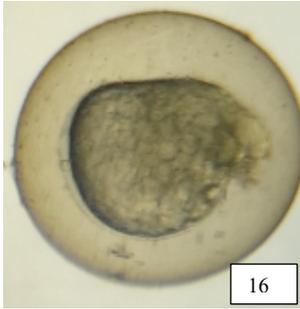
6.14. 5.2.5. Índice de respuesta integral del biomarcador (IBRv2)

Los valores de IBR aumentaron a medida que aumentaban las concentraciones de FLX. Así, a medida que aumentaban las concentraciones de este fármaco se observaban efectos más graves en los embriones (**Fig. 7: A**) 72 hpf, **B**) 96 hpf). Según nuestros análisis de IBRv2, los biomarcadores de daño oxidativo tuvieron más influencia en los embriones que las enzimas antioxidantes. El biomarcador de daño oxidativo que más impactó en los embriones fue el HPX. En cuanto al tiempo de exposición, las concentraciones de 15 ng L⁻¹ y 35 ng L⁻¹ mostraron un aumento significativo de los valores medios de IBR.

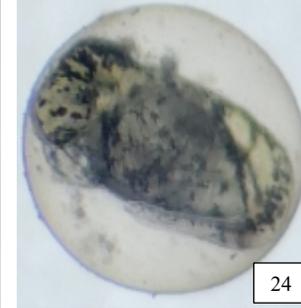
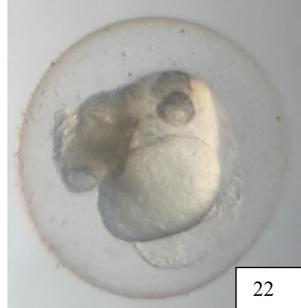
6.15. 5.2.6. Resultados y Discusión primera parte



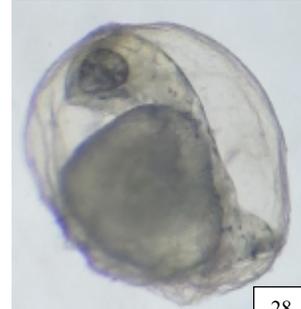
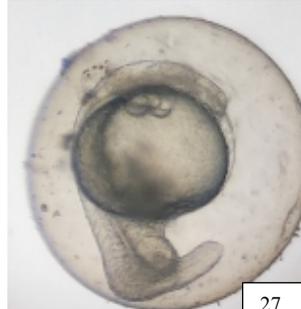
15



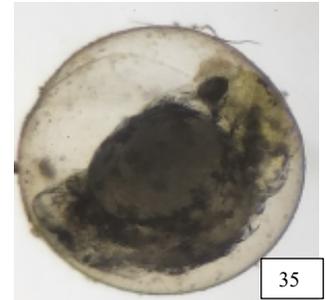
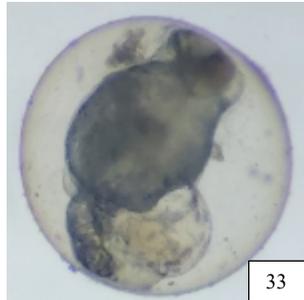
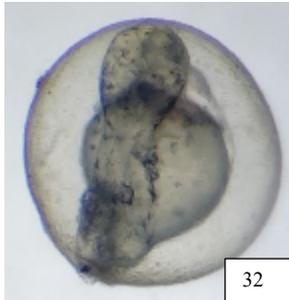
20



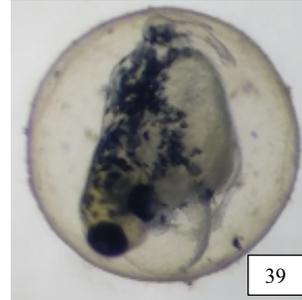
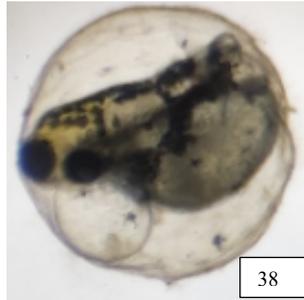
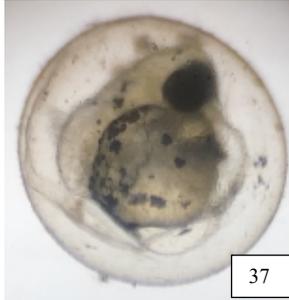
25



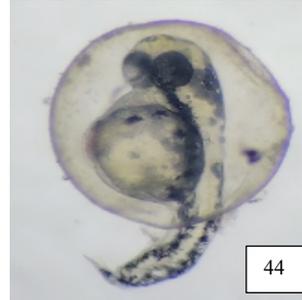
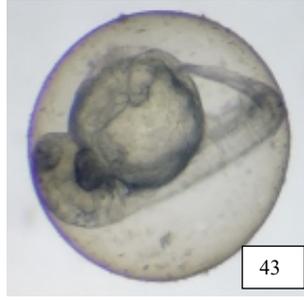
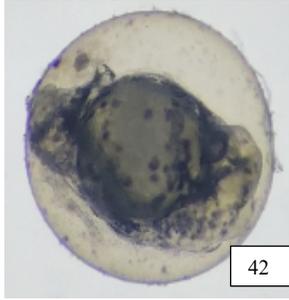
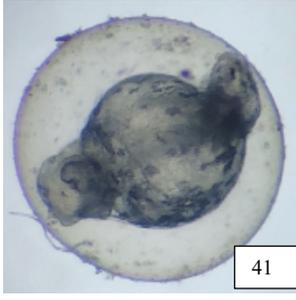
30



35



40



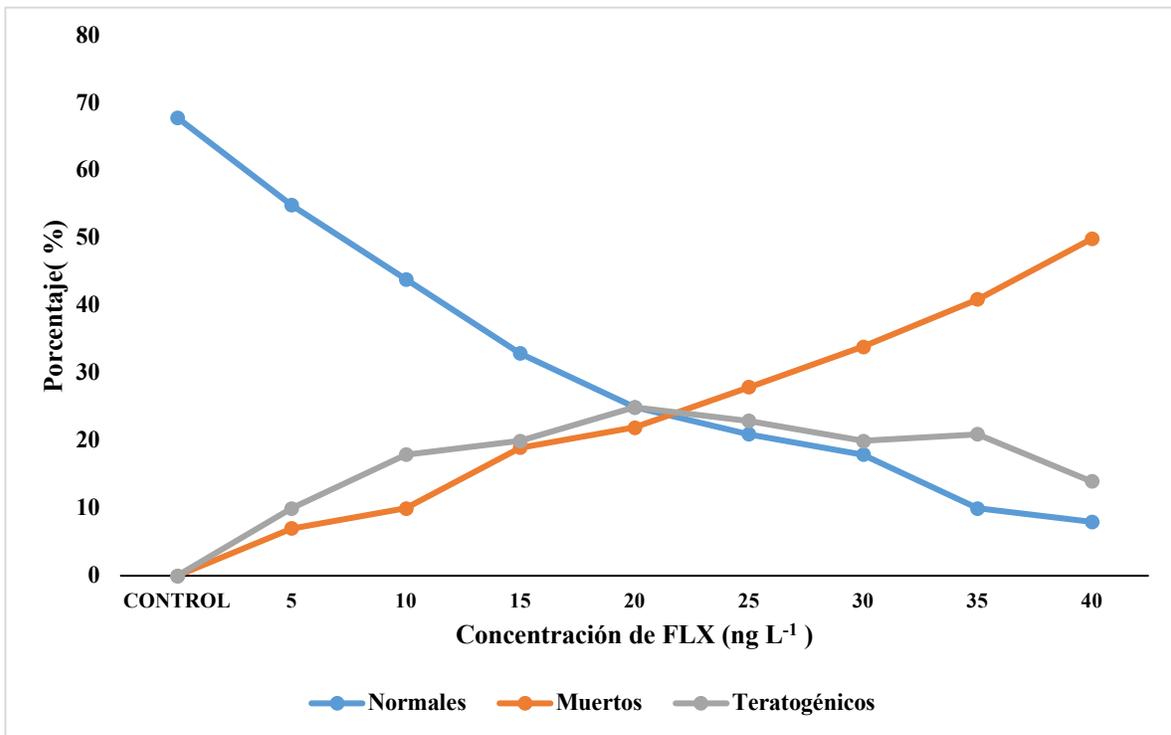


Fig 2. Porcentaje de organismos normales, muertos y teratogénicos.

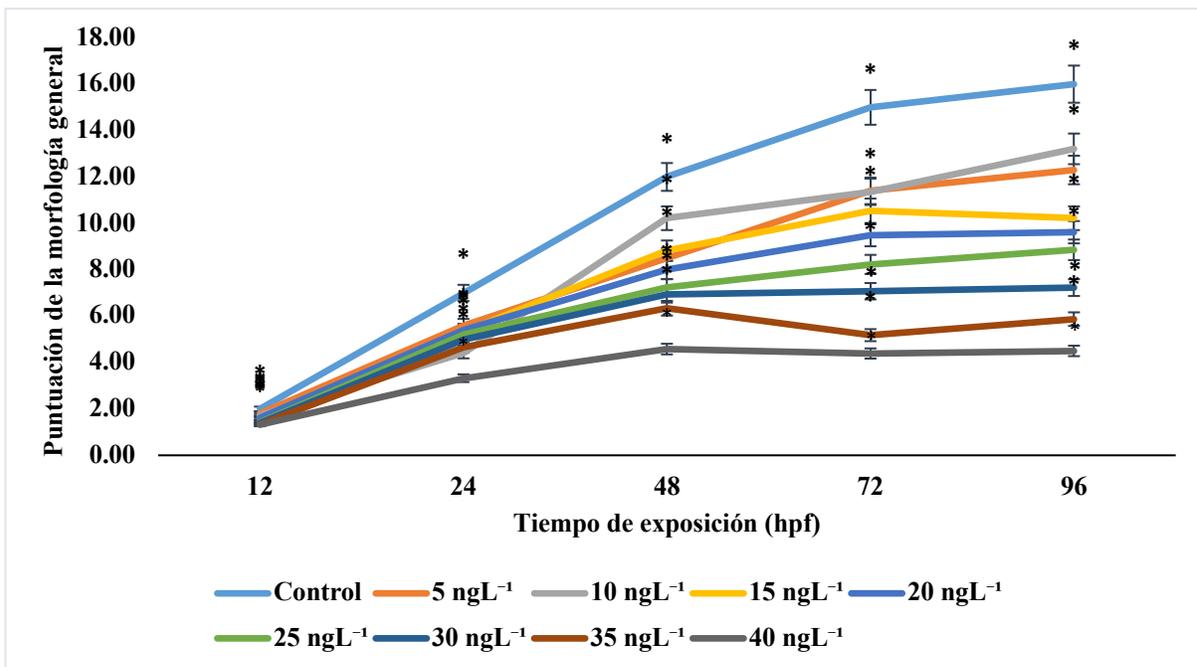


Fig 3. Curvas de concentración-respuesta de FLX en embriones de *Danio rerio*.

***Todas las concentraciones de FLX fueron significativamente diferentes del control.(ANOVA de 2 vias, prueba post-hoc de Student Newman Keuls, $F(8,32)= 482$; $p<0.001$)**

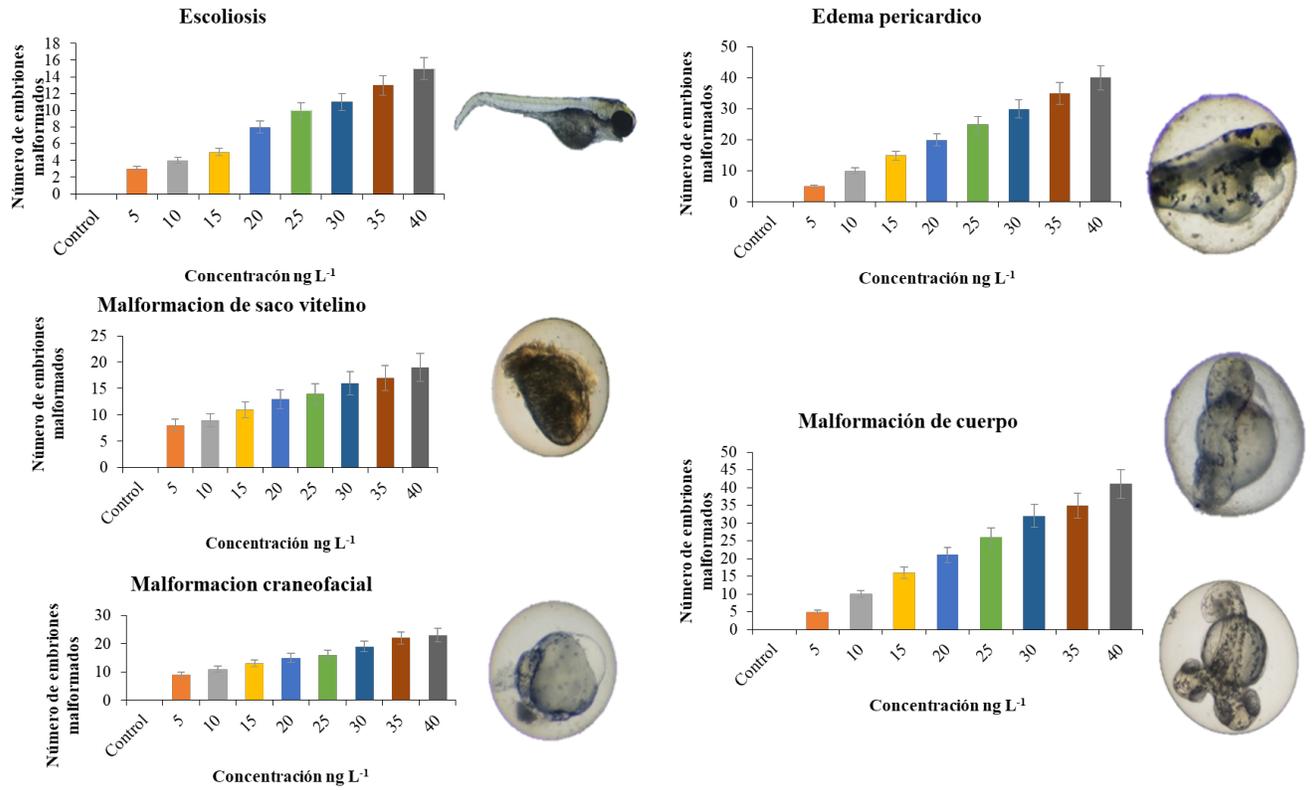
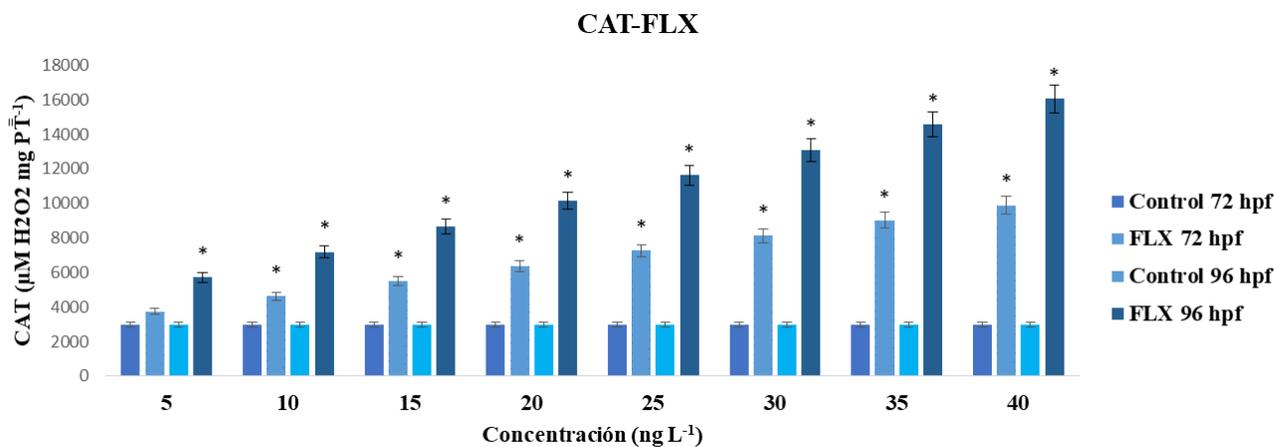
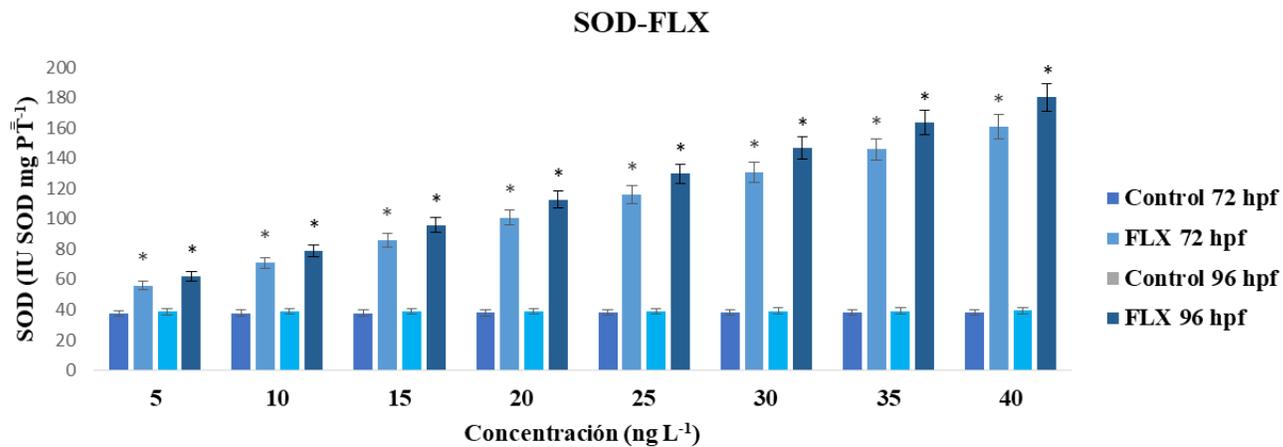


Fig 4. Malformaciones más graves y frecuentes inducidas por la exposición a concentraciones de FLX en embriones de *D. rerio*.



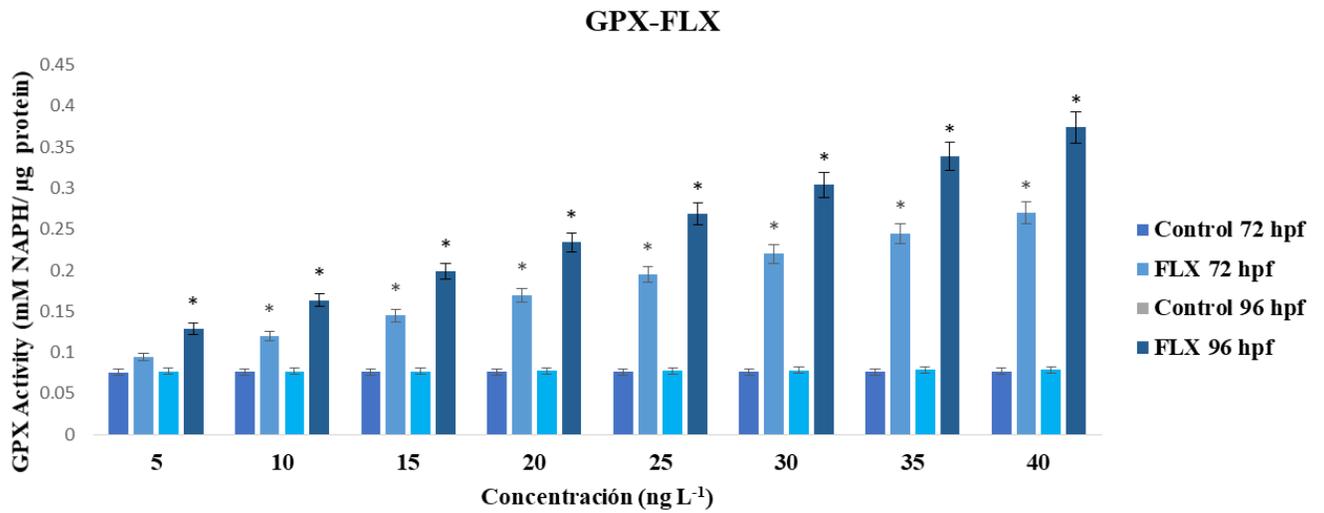
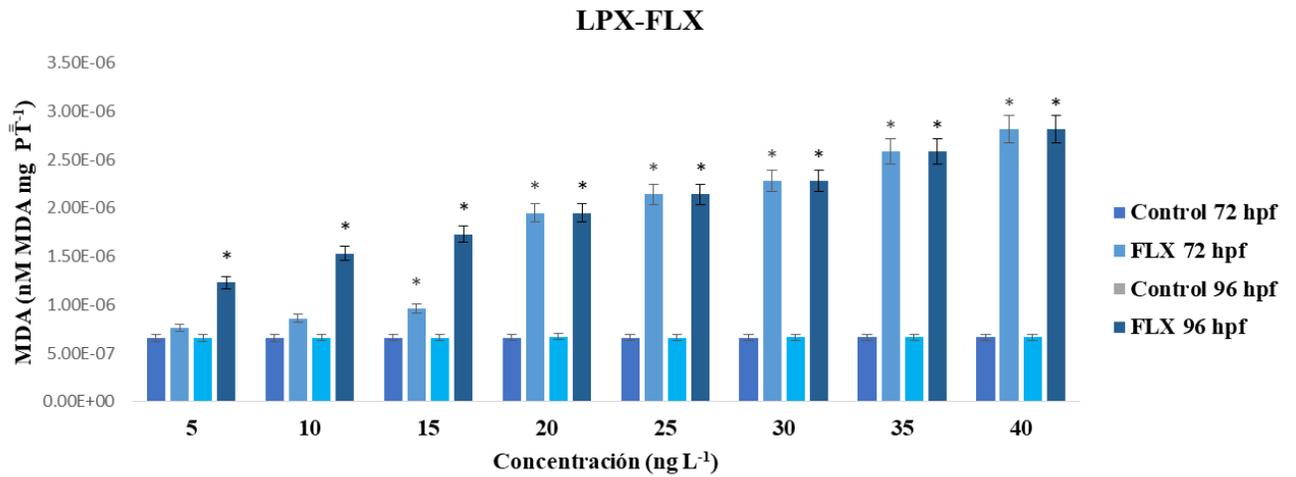


Fig 5. Biomarcadores de actividad antioxidante: A) Superóxido dismutasa (SOD) ($F(8.244) = 643,922$; $n = 9$; $p < 0,001$), B) Catalasa (CAT) ($F(8.244) = 3,145$; $n = 9$; $p < 0,042$) y C) Glutación peroxidasa (GPX) ($F(8.244) = 92,324$; $n = 9$; $p < 0,001$) en embriones de pez cebra D. rerio expuestos a ocho concentraciones diferentes de FLX a las 72 y 96 hpf. Los valores son la media de tres réplicas \pm SE.



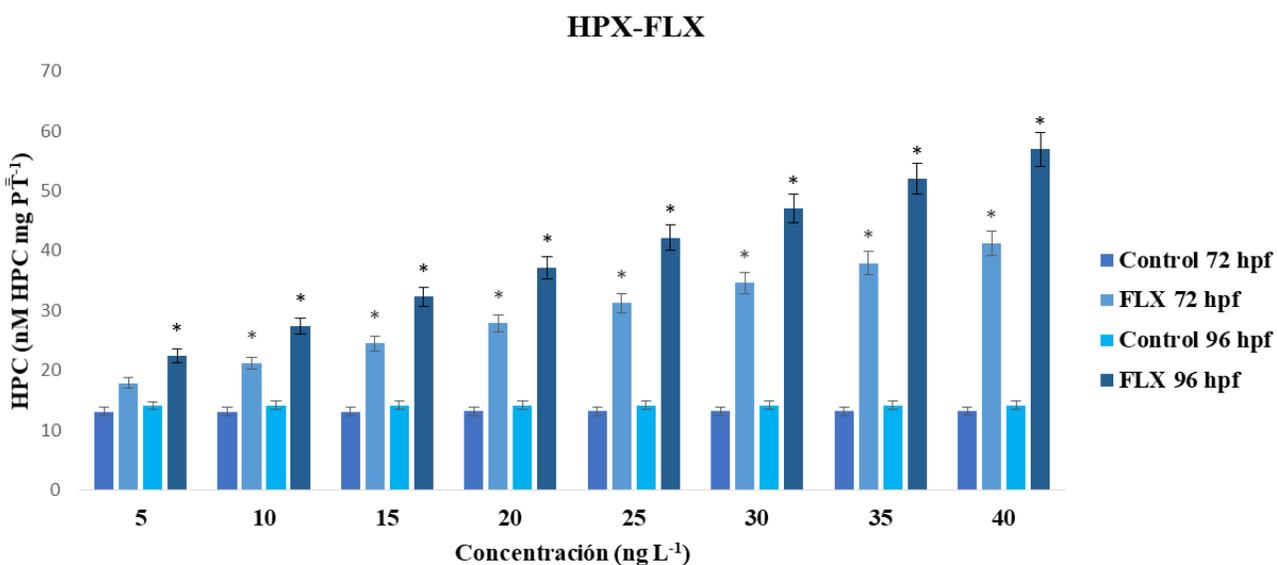
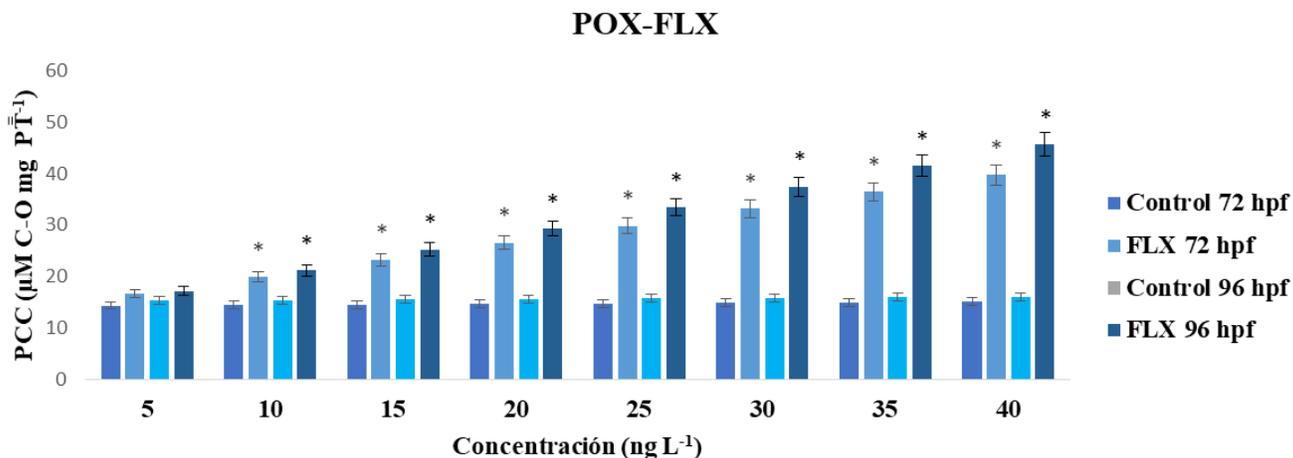
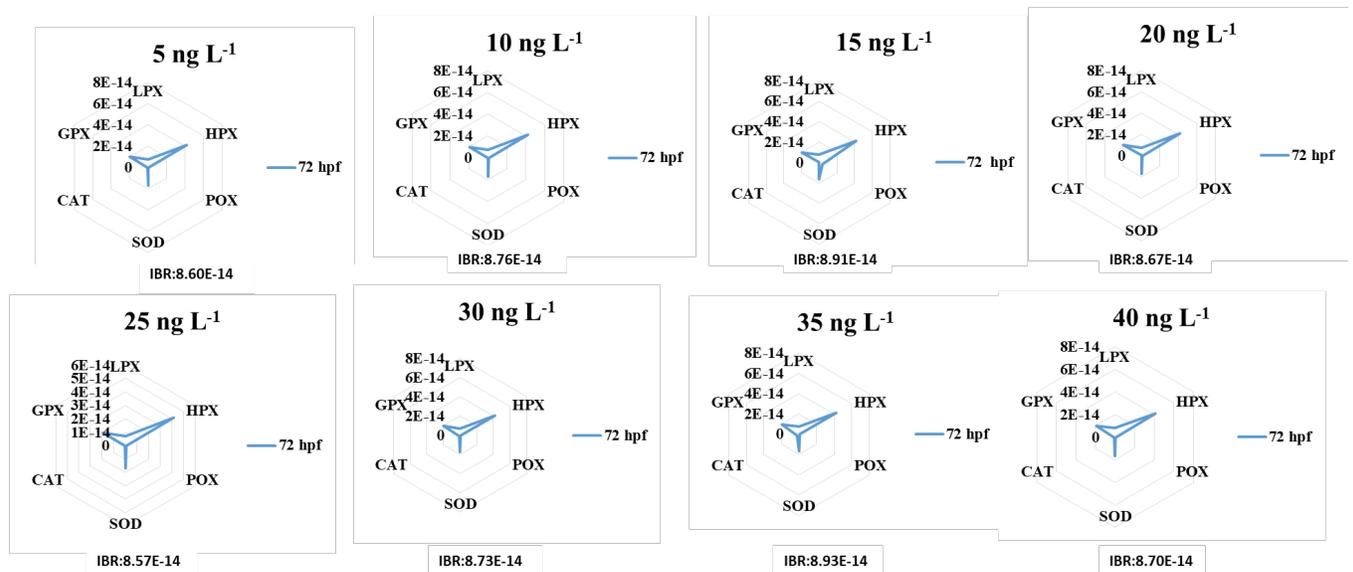


Fig 5. Biomarcadores de oxidación celular: A) Peroxidación de lípidos (LPX) ($F(8.244) = 134,325$; $n = 9$; $p < 0,001$), B) Contenido de carbonilos en proteínas (POX) ($F(8.244) = 23,278$; $n = 9$; $p < 0,001$) y C) Contenido de hidroperóxidos (HPX) ($F(8.244) = 73.132$; $n = 9$; $p < 0.001$) en embriones de pez cebra *D. rerio* expuestos a ocho concentraciones diferentes de FLX a las 72 y 96 hpf. Los valores son la media de tres réplicas \pm SE.

A



B

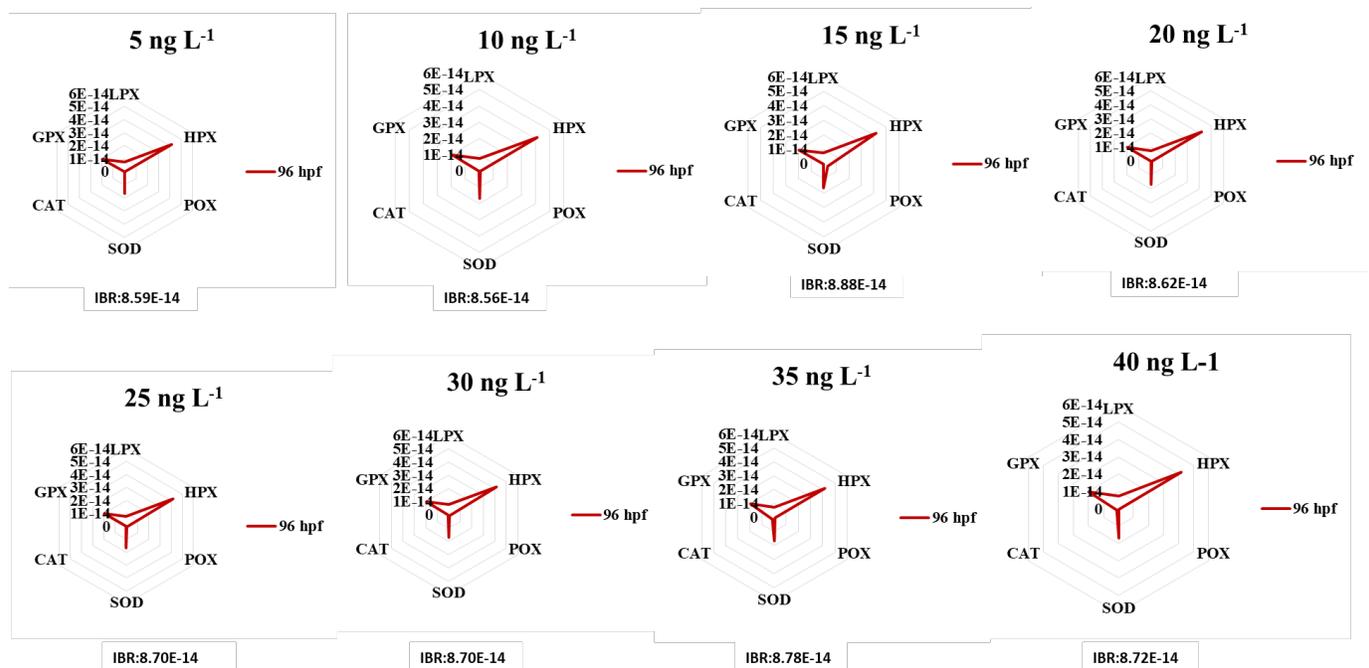


Fig 7. Índice de integrado de biomarcadores: gráfico de estrellas para el índice IBRv2 calculado de los biomarcadores de estrés oxidativo en embriones de *D. rerio* expuestos a FLX a A) 72 hpf y B) 96 hpf

6.16. 5.3 DISCUSIÓN PRIMERA PARTE

6.17. 5.3.1 DISCUSION

Los hallazgos identificados en este trabajo nos permiten señalar que la FLX en concentraciones ambientalmente relevantes puede alterar el desarrollo embrionario y generar efectos teratogénicos en las primeras etapas de la vida del pez cebra. Dado que el FLX es un compuesto muy recalcitrante y lipofílico, este fármaco puede distribuirse ampliamente en los medios acuáticos y, en consecuencia, bioacumularse en organismos como *Cyprinus carpio*, *Dorosoma cepedianum*, *Ameiurus nebulosus*, *Morone americana*, *Catostomus commersoni*, *Pimephales promelas*, *Carcharhinus leucas*, produciendo efectos deletéreos en ellos (Chu y Metcalfe, 2007; Dorelle et al., 2020; Duarte et al., 2020; Nowakowska et al., 2020; Ramírez et al., 2007; Schultz et al., 2010).

Nuestros resultados en el ensayo ZFET mostraron que la CL50 de FLX en embriones de pez cebra fue de 30 ng L⁻¹ con un intervalo de confianza del 95% de 26.3-35.5. La CL50 para FLX en embriones de otras especies acuáticas fue de 705 µg L⁻¹ a 48 hpf, para *Pimephales promelas* (Brooks et al., 2003), 7,5 mg L⁻¹ a 96 hpf, para *Xenopus laevis* (Richards y Cole, 2006), 546 µg L⁻¹ a 7 días, para *Gambusia affinis* (pez mosquito) (Henry y Black, 2008), y 5.5, 1.3, 0.2 mg L⁻¹ a las 96 h a pH 7, 8 y 9, respectivamente, para *Oryzias latipes* (Nakamura et al., 2008). Sobre la base de estos datos, podemos concluir que *D. rerio* es más sensible a los efectos del FLX que los otros organismos mencionados.

Los efectos de FLX en los embriones están relacionados con la capacidad de este fármaco para unirse a la vitelogenina, que es una proteína precursora de la formación de la yema del huevo (Soares et al., 2009). Dado que el FLX tiene las propiedades fisicoquímicas para atravesar la membrana coriónica del pez cebra, puede ejercer sus efectos sobre los ovocitos. Pan et al., (2018), expusieron embriones de *D. rerio* a varias concentraciones (0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg L⁻¹) de FLX. A las 72 h, determinaron la captación del antidepresivo en la yema del embrión obteniendo valores de 0.022, 0.044, 0.389, 1.88 y 29.7 µg L⁻¹ respectivamente, para cada concentración probada. Estos resultados muestran que la FLX puede atravesar el corion y ejercer sus efectos tóxicos en embriones de pez cebra

Al evaluar las alteraciones en el desarrollo embrionario del pez cebra por la exposición a FLX, observamos que las malformaciones del saco vitelino y el edema pericárdico se presentaron en una alta proporción y de manera dependiente de la concentración. Hollert et al. (2003), refieren que esta afectación puede explicarse por el daño a la membrana celular que conduce a una alteración osmótica con la consecuente hiperacumulación de líquidos. El edema pericárdico es una malformación que compromete la integridad de los embriones, debido a la acumulación de líquido en el intersticio del

pericardio, lo que aumenta el tamaño del corazón y la contracción cardíaca (Zodrow et al., 2004). Tanto el edema pericárdico como las malformaciones del saco vitelino se habían evidenciado en otros estudios realizados en peces cebra expuestos a FLX (3, 5, 6, 12, 24 y 48 mg L⁻¹) (Ducharme et al., 2013; Zindler et al., 2019). En este estudio, observamos estas malformaciones a concentraciones mucho más bajas (5-40 ng L⁻¹), y documentamos una nueva alteración (formación de burbujas en el saco vitelino), que no había sido evidente en otros estudios. La formación de burbujas en el saco vitelino está relacionada con la hiperacumulación de agua en el embrión (Pereira et al., 2019).

La escoliosis fue otra malformación esquelética importante observada en los embriones expuestos a FLX. Ésta se caracteriza por la curvatura lateral de la columna vertebral y suele producirse cuando hay defectos en la formación de la columna vertebral durante la etapa de embriogénesis. Los teleósteos como *D. rerio* tienen una susceptibilidad natural a desarrollar deformidad espinal, esta situación está asociada a factores genéticos y ambientales (Grimes et al., 2016). En el grupo de control de este estudio no se observaron alteraciones esqueléticas en los embriones, sin embargo, en los embriones expuestos a FLX se produjo escoliosis. La aparición de escoliosis en los embriones puede deberse a que el FLX (5-40 ng L⁻¹) genera un deterioro de la neurogénesis y anomalías del aparato locomotor, así como deformidades en la columna vertebral sin que vuelvan a su posición normal (Stewart et al., 2013; Zindler et al., 2019).

Otra alteración inducida por la exposición de los embriones al FLX fue el retraso en la eclosión. Esta malformación también afectó al desarrollo y la supervivencia de los embriones. Por ejemplo, los embriones que eclosionan temprano son inmaduros e incapaces de realizar sus funciones en el medio acuático, por otro lado, los que eclosionan tarde son más susceptibles de ser dañados por los contaminantes que se encuentran en el medio ambiente porque sus respuestas de defensa no están completamente desarrolladas (Hallare et al., 2005). Cuando se produce el proceso de eclosión en el pez cebra, los movimientos del embrión dentro del corion son indispensables para el desarrollo embrionario. En este proceso, la participación de la enzima coriónica y la ruptura osmótica es fundamental para que las larvas eclosionen.

El retraso en la eclosión inducido por FLX en este estudio, podría explicarse por la ausencia de movimientos del embrión que no favorecen la salida de la larva. Estos hallazgos se relacionan con lo establecido por Tierney (2011), quien informó que la FLX inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa, generando una miopatía progresiva de los músculos esqueléticos y consecuentemente la pérdida de movilidad del embrión.

La hipopigmentación fue también una de las alteraciones con mayor prevalencia en los embriones expuestos al FLX. Este hallazgo podría explicarse porque el FLX produce la disfunción de dos transcritores del receptor de serotonina (SERT-serotonina) y del 5-HT1 (ácido 5-hidroxiindoacético 1), presentes en la médula espinal. La disfunción de este último y de su metabolito, la melatonina, en el sistema nervioso central, genera trastornos mentales y enfermedades fisiológicas de la piel como la hipopigmentación (Arck et al., 2006; Slominski et al., 2003) Es bien sabido que el 5HT1 promueve la melanogénesis en el pez cebra. Estos hallazgos son consistentes con el estudio realizado por Zhou et al. (2018), quienes identificaron que a la concentración de 1 µg L⁻¹, se observó hipopigmentación en embriones *D. rerio*.

Margolis et al. (2016), refieren que el FLX puede alterar las funciones de SERT-serotonina y 5-HT1, generando una alteración en la organogénesis y morfogénesis de los organismos, que se manifiesta en malformaciones de cabeza, cuerpo y cola en embriones de pez cebra. Estos hallazgos son consistentes con los observados en nuestro estudio, ya que exposiciones a FLX de 5 a 40 ng L⁻¹ producen malformaciones de la cola y malformaciones craneofaciales. La presencia de ISRS como el FLX en el medio ambiente puede provocar efectos en el sistema nervioso central y generar alteraciones en la señalización de los factores de crecimiento. Estas alteraciones son consecuencia de la reducción de la secreción de antagonistas de dos factores de crecimiento 1) proteína morfogenética ósea (BMP o Nodal) y 2) Wnt, presentes durante el desarrollo embrionario. La sobreexpresión de Wnt o la disminución de la expresión de BMP inhiben el desarrollo de la cabeza. Cuando hay una elevada sobreexpresión de BMP, se produce una interferencia en la formación del tallo o cuerpo del embrión del pez. La reducción combinada de la señalización de BPM y Wnt induce cabezas adicionales (Foley et al., 2000; Niehrs, 2004). La sobreexpresión o inhibición en la expresión de estos antagonistas del factor de crecimiento podría explicar las malformaciones de bifurcación del cuerpo y la cabeza identificadas en este estudio.

Este estudio demostró que la fluoxetina en concentraciones ambientalmente relevantes era capaz de alterar la morfogénesis temprana del pez cebra, provocando la aparición de malformaciones en el embrión como: formación de burbujas en el saco vitelino, malformación corporal, malformación craneofacial, retraso en la eclosión, bifurcación de la cabeza, hipopigmentación, edema pericárdico, escoliosis, malformación de la cola y malformación del saco vitelino.

Algunas de estas alteraciones repercutirán en la fase alevín o provocarán la muerte de *D. rerio*. Dado que el consumo de FLX ha aumentado considerablemente en el último año, su presencia en las masas de agua conlleva riesgos para las poblaciones de organismos acuáticos presentes en estos entornos.

Un posible mecanismo por el que la FLX puede inducir su embriotoxicidad en los peces es el estrés oxidativo. En la literatura, se ha informado de que las especies reactivas de oxígeno actúan como mensajeros y como vía de señalización para inducir el crecimiento o la muerte celular. Por lo tanto, el estrés oxidativo puede alterar la proliferación, el desarrollo y el crecimiento del embrión. En nuestro estudio, demostramos que la exposición a FLX en concentraciones ambientalmente relevantes puede alterar el equilibrio redox durante las primeras etapas del pez cebra. Estos hallazgos son congruentes con (Duarte *et al.*, 2020), quienes reportaron que la FLX en concentraciones de 0.3 a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ indujo un incremento en la respuesta antioxidante al inhibir las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GST) causando peroxidación de lípidos y daño al ADN en juveniles de *Argyrosomus regius*. En el presente estudio, encontramos que la FLX a concentraciones de 15 a 40 ng L^{-1} presentó un aumento de la actividad de SOD, CAT y GPX, así como un aumento de LPX, POX y HPX. Carlos Fernández *et al.*, 2013 y Pan *et al.*, 2018 indicaron que la toxicidad de FLX se ha relacionado con el aumento de la producción de ROS, y un efecto inhibitor sobre las enzimas de biotransformación de la familia del citocromo P450. Sin embargo, Chen *et al.* (2018) informaron que la exposición aguda (4 h) y crónica (42d) de peces chinos juveniles (*Pseudorasbora parva*) a 0, 50 y 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de FLX indujo un aumento en los niveles de LPX. Finalmente, Aliko *et al.* (2021) indicaron que la exposición de renacuajos de sapo común *Bufo bufo* a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ FLX, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ IBU y su mezcla fueron capaces de inducir especies ROS en los embriones y, en consecuencia, afectar al desarrollo de los renacuajos.

En resumen, y basándonos en estudios anteriores, propusimos un posible mecanismo a través del cual la FLX puede inducir estrés oxidativo en los embriones de pez cebra (Anexo 1). La FLX puede inducir estrés oxidativo a través de su desmetilación, que es llevada a cabo por enzimas de la familia CYP450 (CYP1a1, CYP3a65) presentes en los embriones de pez cebra. Una vez desmetilado la FLX, se generan ROS, lo que conduce a la inhibición de las enzimas CYP450 biotransformadoras, enzimas CYP450. Además, las ROS generadas también pueden producir la oxidación de biomoléculas como los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas, lo que conduce a cambios en la síntesis del ácido retinoico que es indispensable para el desarrollo embrionario, ya que en bajas cantidades genera malformaciones en los embriones. Las ROS generadas por la biotransformación del FLX también pueden afectar a la síntesis de cortisol, alterando las funciones neuronales que se expresan en el comportamiento. Finalmente, las ROS también pueden disminuir la cantidad de calcio en la célula por la presencia de H_2O_2 , generando daños en las mitocondrias y afectando las funciones de

neurotransmisión, el metabolismo celular, el control de los canales iónicos (Na^+ , K^+), la expresión génica, la muerte celular, la funcionalidad del citoesqueleto y la estimulación de los receptores de glutamato. Por lo tanto, las concentraciones ambientalmente relevantes de FLX (5 a 40 ng L⁻¹) presentes en las masas de agua pueden generar estrés oxidativo por vía intrínseca o extrínseca, lo que representa un riesgo para las especies que están en contacto con este tipo de fármacos.

CONCLUSION

La concentración letal 50 de FLX para los embriones fue de 30 ng L⁻¹, mientras que la concentración efectiva de malformación fue de 16 ng L⁻¹. Los principales efectos teratogénicos encontrados fueron: edema pericárdico, retraso en la eclosión alteraciones de la columna vertebral, como la escoliosis, y malformaciones craneofaciales. Estas malformaciones descritas son el resultado de la oxidación de biomoléculas y de la alteración de las vías de señalización en las que participan los ROS. Por lo tanto, podemos concluir que las concentraciones ambientalmente relevantes de fluoxetina (5-40 ng L⁻¹) pueden inducir estrés oxidativo en embriones de *D. rerio*, lo que conduce a un desarrollo anormal de los organismos, y luego a su muerte. Los estudios futuros deberán evaluar los efectos tóxicos que la concentración ambientalmente relevante de FLX puede generar en la etapa larval y en la etapa adulta del pez cebra.

6.0. METODOLOGÍA PARA ADULTOS DE *D. RERIO* (segunda parte experimental)

6.1. Obtención y aclimatación del pez cebra

Los adultos de pez cebra de tipo salvaje (cepa AB; 5 peces/l) se mantuvieron en un acuario suministrado con agua del grifo aireada, de clorada, filtrada con carbón y esterilizada por rayos UV (27 °C ± 1 °C 14 h de luz: 10 h de oscuridad). El oxígeno disuelto (9,8 ± 0,5 mg/L), el pH (7,4 ± 0,17), la conductividad (373 ± 30 S/cm), el contenido de nitrato (2,9 ± 0,3 mg/L) y el contenido de nitrito (0,030 ± 0,009 mg/L) fueron monitorizados y controlados durante el mantenimiento de los peces cebra, así como durante los experimentos posteriores.

Los ejemplares de pez cebra (*Danio rerio*) adultos, se distribuyeron aleatoriamente entre 4 tanques experimentales, con 10 individuos por tanque, y se aclimataron a las condiciones de exposición durante 96 h. La prueba de toxicidad aguda semiestática se realizó de acuerdo con las directrices de la OCDE (N° 203) durante 96hrs en tanques de vidrio de 18L con aireación de la superficie con

periodos de luz/oscuridad natural(14h:10h) y alimentados con TetraMinMR para peces. Se colocaron 3 concentraciones del antidepresivo fluoxetina y un tratamiento control (5 ,16 y 40 ng L⁻¹). Se realizaron renovaciones de agua cada tercer día, y las concentraciones de FLX se restablecieron adecuadamente. La alimentación se suspendió 24 horas antes de la prueba Novel Tank Test, para evitar la presencia de partículas orgánicas en el medio.

Después de 96h de exposición, los peces fueron transferidos a tanques individuales de comportamiento y se aclimataron durante 10 min en el nuevo entorno antes de cada ensayo, para evitar la interferencia del estrés por manipulación. Todos los tanques se cubrieron durante los ensayos experimentales y las observaciones se realizaron en alta definición, para minimizar cualquier estrés o sesgo causado por el contacto visual/presencia humana.

6.2. Novel Tank Test

Se seleccionaron peces de forma individual al azar, se les colocó una red y se les introdujo en un tanque rectangular (aproximadamente 21.2 (cm) x 21.2 (cm) x 25.2 (cm)) con capacidad 15 L, durante 6 min. El comportamiento de los peces fue grabado y posteriormente analizado con el software de seguimiento de movimiento Tox Track Ink. Se analizaron los siguientes parámetros de comportamiento de ansiedad: la distancia total (cm) recorrida, distancia recorrida en la parte superior e inferior (cm), latencia para entrar en la parte superior (s), tiempo que permaneció en la parte superior e inferior (s), la frecuencia de transiciones top>bottom, bottom>top y la duración de la congelación. Un pez que demuestre un comportamiento de ansiedad será menos propenso a explorar la parte superior del tanque y mostrará un mayor comportamiento de congelación.

6.3. Eutanasia y disección

Quince minutos después de la introducción en la prueba del tanque novedoso, cada pez fue colocado individualmente en un vaso de precipitado de 50 mL para inducir un choque hipotérmico (2 oC – 4 oC) acorde a la directriz AVMA Guidelines on Euthanasia 2020 Edition. La muerte se determinó al examinar visualmente el cese completo del movimiento opercular (branquias) y la falta de respuesta a la estimulación táctil. A continuación, se diseccionaron los peces; la parte frontal de la cabeza para extracción de cerebro (pull de 10 cerebros) se introdujeron en un tubo eppendorf con 1.5 mL de solución de buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4) y se almacenó a -80 °C hasta la extracción y el análisis de la actividad de acetilcolinesterasa y la determinación de los biomarcadores de estrés oxidativo.

6.4. Determinación de los biomarcadores de estrés oxidativo

Las muestras se separaron en dos tubos Eppendorf. Por un lado, el tubo 1 contenía 300L del homogeneizado y 300L de una solución de ácido tricloroacético (TCA, 20%). Por otro lado, el tubo 2 contenía 700L del homogeneizado. Todos los tubos se mantuvieron a -20oC hasta su utilización. El tubo 1 se centrifugó a 11 495 rpm durante 15 minutos a 4oC y el precipitado se utilizó para determinar el contenido de carbonilo proteico (PCC), mientras que el sobrenadante se utilizó examinado para establecer el grado de LPX y el contenido de hidropéroxido (HPC). El tubo 2 se centrifugó a 12 500rpm durante 15 minutos a 4oC y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes: CAT, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx).

El grado de LPX se evaluó con el método reportado por Buege y Aust, (1978). Los resultados se expresan como nM de malondialdehído, obtenidos por la concentración ambiental medida de $1,56 \times 10^5$ M/cm por mg de proteína por g de tejido.

El PCC se determinó por el método descrito por Levine et al., 1994, con algunas modificaciones. Los resultados se expresan como nM de carbonilos reactivos, obtenidos por las concentraciones ambientales medidas de 21, 000 M/cm por mg de proteína por g de tejido.

El HPC se cuantificó por el método de Jian et al., 1992 y los resultados se expresan como nM de cumeno por mg de proteína por g de tejido.

La actividad SOD se estableció por el método de Misra y Fridovich, 1972 y los resultados se expresan como U SOD por mg de proteína por g de tejido

La actividad de la CAT se estimó por el método de Radi et al., 1991 y los resultados se expresan como mM de H₂O₂ por mf de proteína por g de tejido.

La actividad de GPx se midió por el método de Gunzler y Flohe-Clairborne, 1985 y los resultados se expresan como U/L de GPx por mg de proteína por g de tejido.

Todos los resultados de los biomarcadores se normalizaron con respecto a las proteínas totales, que se midieron por el método de Bradford, 1976. Además, los experimentos se repitieron tres veces.

6.5. Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa

Los peces se colocaron en un baño de hielo, se removió cuidadosamente la parte superior del cráneo y los nervios craneales fueron cortados desde su origen para remover todo el cráneo. Se extirpo todo

el cerebro y se pesó, posteriormente se homogenizó en 0.1M de buffer de fosfatos pH 8 (20 mg de tejido cerebral /ml de buffer). Posteriormente al homogeneizado se centrifugó con microcentrifuga refrigerada a 4° C por 15 min a 10000 x g y el sobrenadante se extrajo para la determinación de acetilcolinesterasa.

La actividad enzimática fue determinada inmediatamente por duplicado con base al método colorimétrico de Ellman et al., (1961). Se utilizó acetilcolina yodada (ACTh) con 5,5 -ditiobis-2-nitrobenzoate(DTNB) como indicador de tior. La mezcla de reacción contiene 2.6 mL de buffer de fosfatos (pH 8.0, 0.1M) 0.1 mL DTNB(0.01 M en 0.1M de buffer de fosfatos pH 7, 15 mg de bicarbonato de sodio por cada 10 mL de solución) con la adición de 400 µL de sobrenadante.

6.6 RESULTADOS DE LA SEGUNDA PARTE EXPERIMENTAL EN ADULTOS DE *DANIO RERIO*

6.6. Graficas de comportamiento

Los parámetros evaluados en la prueba Novel Tank (**Fig. 8**), se observa una disminución de la distancia total recorrida (distancia (cm) parte superior + distancia (cm) parte inferior), lo que expresa una disminución de la conducta exploratoria y puede prevalecer la mayor parte del tiempo en la parte inferior o superior. En este estudio se puede observar que conforme aumenta la concentración de FLX, la prevalencia en la parte superior se hace más notable, expresado como tiempo de latencia (s) en la parte superior. En consecuencia, hay una disminución en el número de transiciones superior-inferior, inferior-superior, lo que representa una mayor duración de episodios de congelamiento o freezing que se define como el cese de movimientos. Estos hallazgos nos permiten informar, que el pez presenta episodios de ansiedad y estrés debido a la exposición aguda a las concentraciones ambientalmente relevantes de FLX.

6.18. Graficas de estrés oxidativo

La actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX, determinada en cerebro de pez cebra adulto *Danio rerio* es reportada por la **Fig. 9, inciso A**). Donde se observa que la actividad de las enzimas es afectada por la exposición a FLX, reportando un incremento respecto al grupo control. Para SOD, CAT y GPX se observa incremento significativo de la actividad conforme aumenta la concentración FLX, presentando mayor respuesta a la concentración de 40 ng L⁻¹.

Los niveles de LPX, POX, HPX en adultos de *Danio rerio* expuestos a FLX se representa en la **Fig 9 inciso B)**. En estos biomarcadores de oxidación celular, se observa un incremento comparado con el grupo control para las tres concentraciones de FLX. En LPX y HPX se observa un incremento significativo conforme aumenta la concentración, presentando una mayor respuesta de daño a 40 ng L-1. Para POX se observa un incremento significativo para la concentración de 16 ng L-1 y una disminución para 40 ng L-1 respecto al grupo control.

6.19. Tabla de la actividad de la acetilcolinesterasa

En la **tabla 5** se reporta la actividad de la acetilcolinesterasa a las diferentes concentraciones de FLX, además de la media, mediana y la desviación estándar. Se puede observar que a la concentración de 5 ng L-1 una mayor actividad respecto al grupo control, en comparación con 40 ng L-1 se observa una disminución de la actividad respecto al grupo control.

6.20. Correlación de Pearson entre los biomarcadores de daño oxidativo y biomarcadores de neurotoxicidad

En la **Fig 10 A) 5 ng L⁻¹ B) 16 ng L⁻¹ y C) 40 ng L⁻¹**, se puede apreciar un gráfico con valores que van desde -1 (rojo) a 1 (azul). Los colores indican el tipo de correlación entre las variables, de esta manera una coloración roja indica una correlación negativa mientras que una coloración azul indica una correlación positiva. Por otro lado, la intensidad del color denota la fuerza de correlación entre las variables. Acorde a lo anterior podemos expresar que a la concentración de 5 ng L-1 de FLX se observa una correlación positiva y fuerte entre los biomarcadores de daño oxidativo, comportamiento y actividad de la acetilcolinesterasa. Además, para la concentración de 16 ng L-1 y 40 ng L-1 se observa una correlación positiva y fuerte entre los biomarcadores evaluados. Y que este efecto es concentración dependiente.

6.21. Resultados y Discusión segunda parte

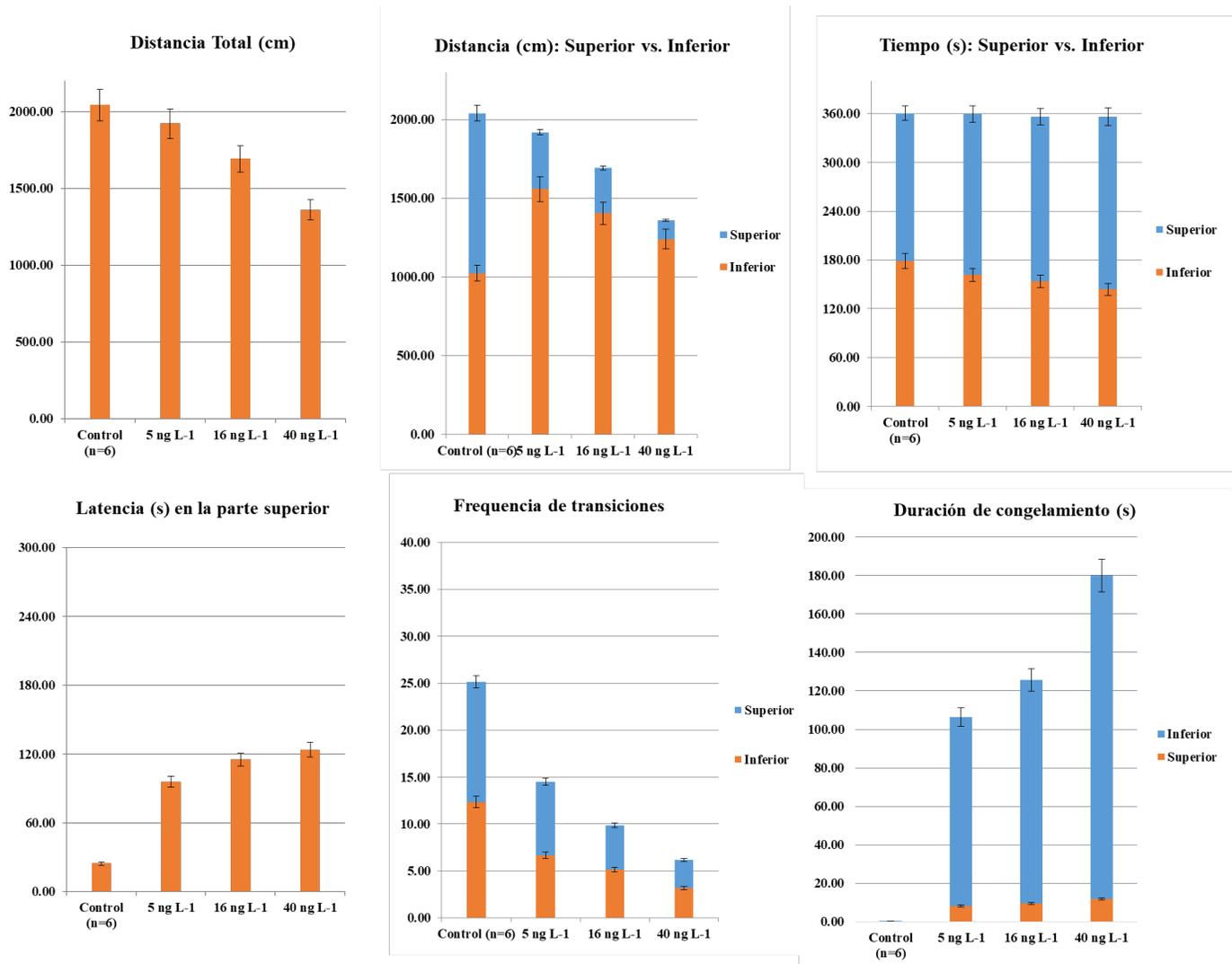


Fig 8. Cambios de comportamiento observados en fsh expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de FLX. Los valores son la media de cada experimento realizado por triplicado \pm SEM. Diferencias significativas en relación con: * grupo de control: ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

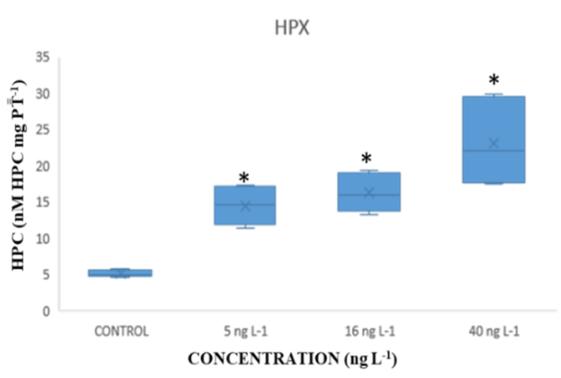
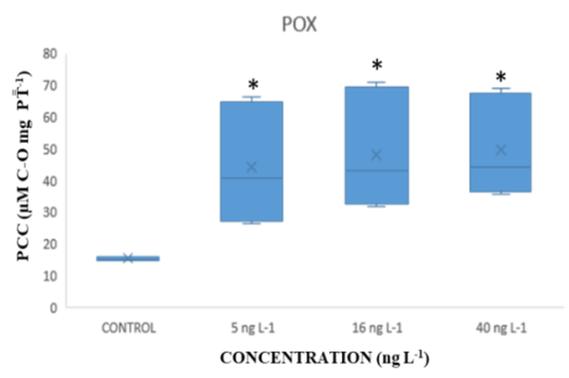
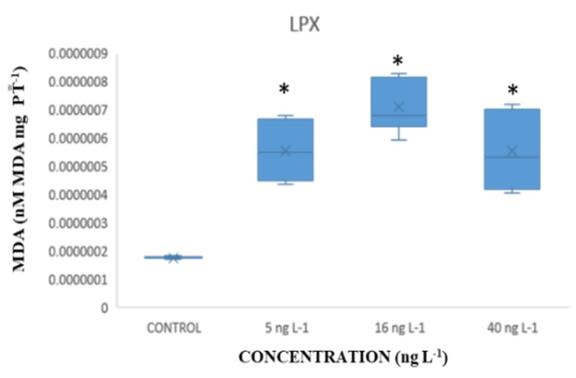
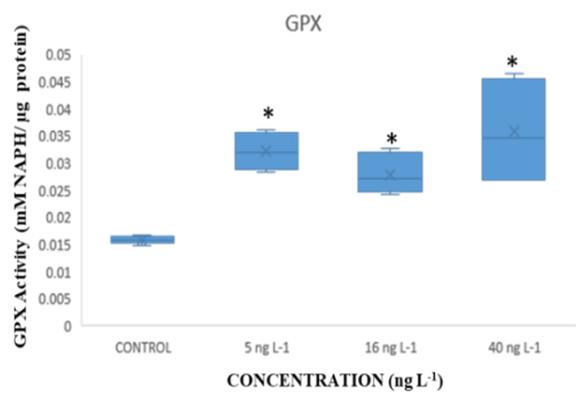
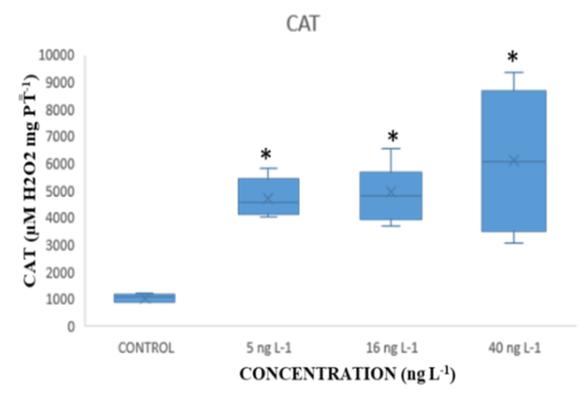
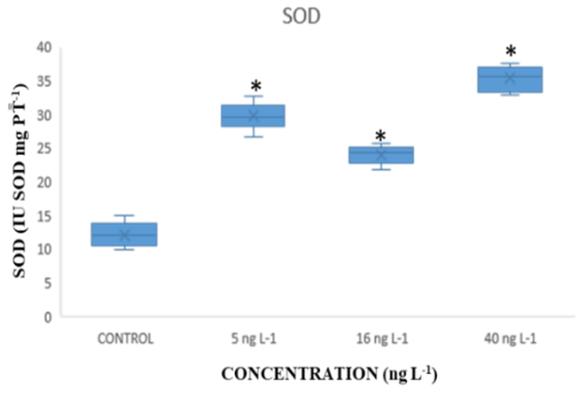
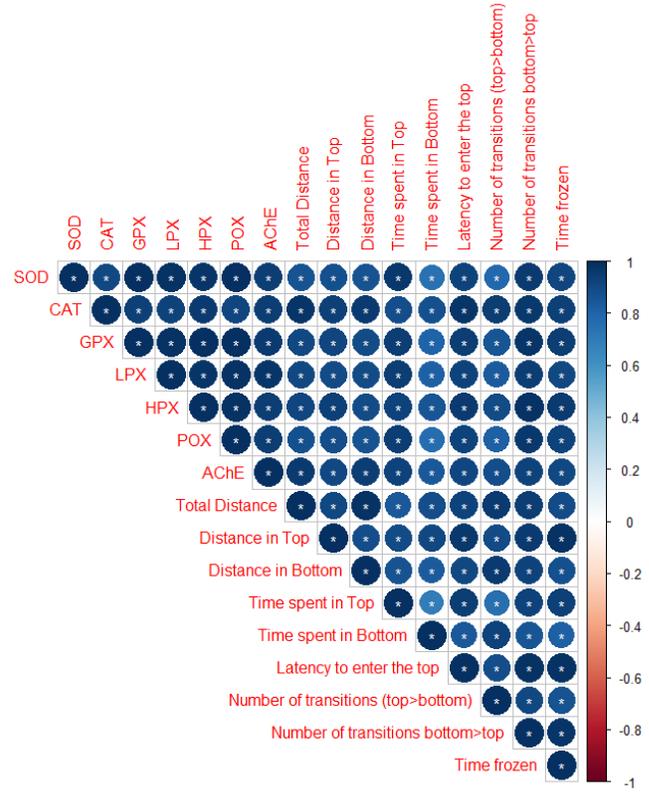
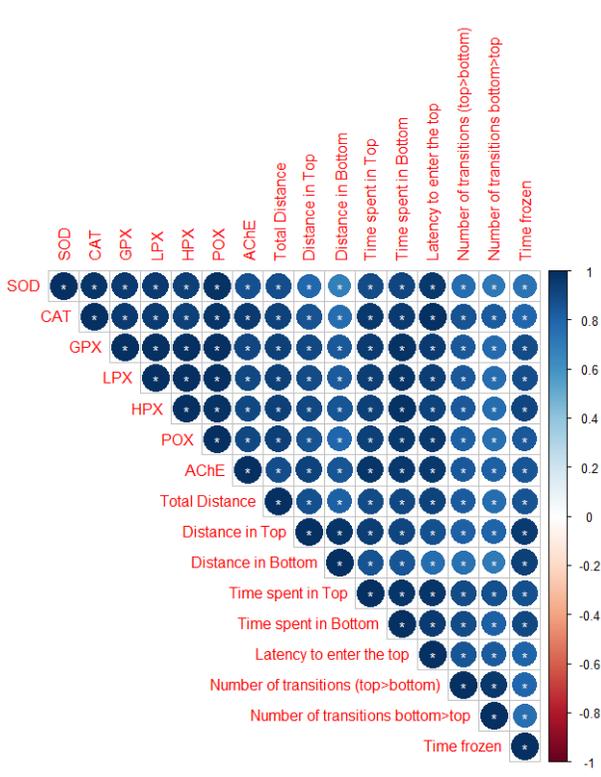


Fig 9. Biomarcadores de estrés oxidativo: Actividad antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) A), y niveles de lipoperoxidación (LPX), proteínas de carbonilo (POX) e hidroperóxidos (HPX) B en cerebros de adultos de D. rerio expuestos a tres concentraciones diferentes de FLX a las A6 horas. (POX), hidroperóxidos (HPX) B en los cerebros de adultos de D. rerio expuestos a tres concentraciones diferentes de FLX a las A6 h. Los valores son la media de tres réplicas \pm SEM. * denota una diferencia significativa en comparación con el grupo de control ANOVA de dos vías ($p < 0,05$).

Concentración	Media	Mediana	Desviación estandar
Control	0.00000223	0.00000241	0.00000125
5 ng L⁻¹	0.00000207	0.00000200	0.00000156
16 ng L⁻¹	0.00000207	0.00000189	0.000000909
40 ng L⁻¹	0.00000120	0.000000990	0.000000635

Tabla 5. Actividad de acetilcolinesterasa: Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa en cerebros de D. rerio expuestos a tres concentraciones ambientalmente relevantes de FLX. Hubo una diferencia significativa en comparación con el grupo de control se realizo un ANOVA de dos vías($p < 0,05$).



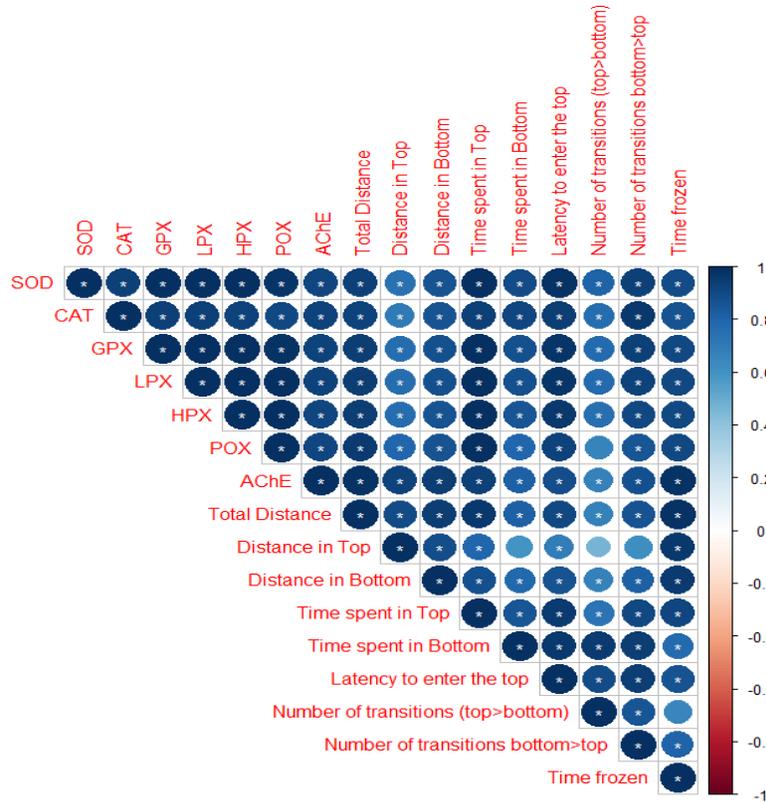


Fig 10: Correlación de Pearson entre los cambios de comportamiento, el estrés oxidativo y la acetilcolinesterasa evaluados en las concentraciones de FLX: A) 5 ng L⁻¹ ,B) 16 ng L⁻¹ , C) 40 ng L⁻¹.

6.22. Discusión

En el presente estudio, se observó y cuantificó el comportamiento del pez cebra mediante la prueba del Tanque Nuevo (Novel Tank Test). Esta prueba se considera altamente sensible para evaluar el efecto de los contaminantes emergentes en el comportamiento del pez cebra y determinar si el organismo presenta episodios de ansiedad o estrés debido a la exposición a FLX. La FLX es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina que puede aumentar las concentraciones de serotonina en el cerebro al bloquear el transportador de serotonina (Corcoran et al., 2010). Estudios anteriores han observado efectos conductuales de la fluoxetina (es decir, agresión y apetito) en los peces.

Nuestros resultados mostraron que los peces sufrían episodios de ansiedad que se evidenciaban en una disminución de la distancia total recorrida, una reducción del tiempo en la parte superior, una mayor latencia para hacer la exploración en la parte superior, una disminución del número de

transiciones a la parte superior y finalmente un aumento de los episodios de congelación. Las concentraciones de 5, 16 y 40 ng L⁻¹ de FLX pueden alterar el comportamiento de natación de los peces. De acuerdo con nuestros resultados, (Egan et al., 2009) informaron que la exposición de adultos de pez cebra a 50 µg L⁻¹ FLX durante 2 semanas indujo una disminución en el tiempo en la parte superior, una menor latencia en la parte superior y un mayor número de transiciones en la parte superior empleando la prueba del tanque nuevo ó Novel Tank Test. Además, Ofoegbu et al. (2019) informaron que la FLX (0.1-1.0 µg L⁻¹) indujo un aumento dependiente de la concentración en la actividad locomotora y una disminución de la alimentación en el organismo *Planaria* de agua dulce *Schmidtea mediterranea*. De manera similar, Farias et al., (2018) informaron que las larvas de pez cebra expuestas a 0.88, 15.8, 281.2, 500 µg L⁻¹ de FLX durante 120, 144 y 168 h redujeron la distancia total de nado, el tiempo total de nado y una alteración en el comportamiento de las larvas cuantificada por una prueba de luz y oscuridad utilizando Zebrabox (ZEB DJH Viewpoint). Finalmente, Martin et al., (2020) informaron que 18 y 215 ng L⁻¹ de FLX indujeron una reducción monotónica del comportamiento en mosquitos adultos de *Fambusia holbrooki*. Esto se hizo utilizando el ensayo de luz-oscuridad en el que observaron una preferencia por un entorno oscuro que está estrechamente relacionado con los episodios de ansiedad.

Se ha establecido que la serotonina desempeña un papel importante en la modulación del comportamiento locomotor y el estado de ánimo en una amplia gama de vertebrados. Estudios anteriores en teleósteos adultos, incluido el pez cebra, han demostrado una relación inversa entre los niveles de serotonina y la actividad natatoria espontánea. Airhart et al., (2007) informaron de que la actividad locomotora observada en larvas de pez cebra se correlacionaba con una disminución de dos transcritos de receptores de serotonina (SERT - serotonina y 5-HT1A - transcrito de receptor de serotonina 1A) en la médula espinal tras la exposición a FLX. Todo lo descrito anteriormente está implicado con la generación de estrés oxidativo debido a la exposición de este tipo de drogas y los efectos que tiene a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC). El sistema nervioso central (SNC) tiene un alto porcentaje de fosfolípidos (ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, fosfato de inositol y diacilglicerol). Los fosfolípidos son moléculas que se oxidan fácilmente formando radicales libres. Los principales radicales libres generados durante la peroxidación de los fosfolípidos son el radical superóxido (O₂*), el radical peroxilo (ROO[•]), el radical hidroxilo (OH) y el (NO[•]) (Caiaffo et al., 2016). Estos compuestos y sus subproductos como el H₂O₂, generan efectos oxidativos en las moléculas y componentes celulares rompiendo el equilibrio entre los procesos prooxidantes y

antioxidantes. Como consecuencia, se produce la condición conocida como estrés oxidativo, que daña lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras estructuras celulares (Caiaffo et al., 2016).

Muchos contaminantes orgánicos pueden causar estrés oxidativo en los peces. La lipoperoxidación se considera un buen biomarcador del daño por estrés oxidativo en los organismos invertebrados acuáticos (Demidchik, 2015; Regoli y Giuliani, 2014). La FLX induce estrés oxidativo a través de la generación de malondialdehído (MDA). Por ejemplo, (Huihui Chen et al., 2015) informaron un aumento de los niveles de MDA en las branquias y glándulas digestivas de la almeja asiática adulta (*Corbicula Huminea*) expuesta a 5 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fuoxetina durante 30 días. En otro estudio realizado por Di Poi et al., (2016), los niveles de MDA en una muestra mixta de branquias y glándulas digestivas de ostras juveniles (*Crassostrea gigas*) aumentaron aproximadamente 4 veces después de 14 días de exposición a 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fuoxetina. Sus resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio, en el que los niveles de MDA aumentaban a medida que la concentración de FLX aumentaba de 5 ng L^{-1} a 40 ng L^{-1} , siendo la última concentración donde se presentó la mayor cantidad de MDA en el cerebro del pez cebra *Danio rerio* expuesto durante 5 días.

El producto más conocido de la peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA), una molécula muy tóxica que afecta a las proteínas y al ADN (componentes de las estructuras celulares) (Caiaffo et al., 2016). Los hallazgos encontrados en este estudio informan de que el FLX induce un aumento del contenido de proteínas carboniladas e hidroperóxidos a la concentración de 40 ng L^{-1} de FLX. La FLX, a través del mecanismo de estrés oxidativo, puede oxidar proteínas y alterar la funcionalidad de las mismas mediante la formación de nuevos agregados de bajo peso molecular.

En el ADN, la oxidación de las bases púricas y pirimídicas resulta en eventos mutagénicos que conducen a la apoptosis. Duarte et al. (2019) informaron daños en el ADN y lipoperoxidación en *Pomatoschistus microps* tras la exposición a 0.1, 0.5, 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de FLX. Esto apoya que la FLX tiene la capacidad de generar efectos genotóxicos incluso a bajas concentraciones.

El daño por estrés oxidativo también implica la alteración de los niveles de enzimas antioxidantes que son la primera línea de defensa de los organismos para protegerse. El sistema de defensa antioxidante incluye los efectos coordinados de algunas enzimas como SOD, CAT y GPX. La SOD es la enzima responsable de catalizar la desmutación de radicales libres como como el O_2 a H_2O_2 , que es menos reactivo y puede ser degradado por otras enzimas como la catalasa o el glutatión peroxidasa. En este caso, hemos demostrado que la actividad antioxidante de SOD, CAT y GPX en el pez cebra adulto expuesto a FLX mostró un aumento significativo en comparación con el grupo de control.

Sin embargo, esta respuesta no mostró una tendencia dependiente de la concentración. De hecho, observamos que, en la concentración media probada, todos los biomarcadores mostraron una disminución en comparación con la concentración más baja y más alta. Lo anterior puede explicarse por el aumento de la producción de ROS en el pez cebra. Por ejemplo, los hallazgos recientes han demostrado que la reducción de la actividad de la CAT está asociada a un aumento del contenido de hidroperóxidos. Además, Caiaffa et al., 2016 informaron que la producción de LPX en el hipocampo y la corteza cerebral aumenta durante la depresión como resultado de una reducción de los niveles de CAT y GPX. De forma similar, Erkan Ozcan et al. (2004) reportaron que la reducción de los niveles de SOD, GPx y CAT es el resultado del aumento de la producción de MDA en organismos con trastornos de ansiedad y estrés. Por lo tanto, los altos niveles de H₂O₂ y LPX en el cerebro de pez cebra durante los estados de ansiedad podrían reducir los niveles de las enzimas antioxidantes.

Un estudio de González-Rey y Bebianno (2013) informó que la exposición a 75 ng L⁻¹ FLX indujo una disminución de la actividad de la SOD en las branquias y glándulas intestinales del mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Nuestros hallazgos reportan una disminución de la actividad SOD a la concentración de 16 ng L⁻¹ y un ligero aumento en la concentración de 40 ng L⁻¹ de FLX después de 96 horas de exposición. Asimismo, un estudio de Hongxing Chen et al. (2018) demostró que la exposición del pez gobio chino *Pseudorasbora parva* expuesto a 0, 50 y 200 µg L⁻¹ de fuoxetina aumentó la actividad de la CAT respectivamente en las branquias. Adicionalmente, González-Rey y Bebianno (2013) informaron que la exposición del mejillón *Mytilus galloprovincialis* a 75 ng L⁻¹ de FLX indujo actividad de CAT. De forma similar, nuestros resultados mostraron un aumento de la actividad CAT y GPX a 40 ng L⁻¹ en cerebros de pez cebra después de 96 h de exposición a FLX.

Franzellitti et al. (2014) observaron un aumento de la actividad GST en *M. galloprovincialis* tras 7 días de exposición a 0.3-300 ng L⁻¹ de fuoxetina. Por último, Hongxing Chen et al. (2018) informaron un aumento de actividad GST en las branquias del pez gobio chino *Pseudorasbora parva* expuesto a 0, 50 y 200 µg L⁻¹ de fuoxetina durante 4 h.

El aumento de las ERO, se debe principalmente a la exposición a FLX y al aumento de MDA generado por la oxidación de lípidos, y la reducción de la actividad de la AChE. La AChE es responsable de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (ACh) a colina y ácido acético, que desempeña un papel importante en la función neuronal colinérgica. Se sabe que la serotonina aumenta los niveles de calcio intracelular (Ca²⁺) y, a su vez, estimula la liberación de acetilcolina (Goldberg et al., 1992). Tanto la serotonina como la acetilcolina pueden intensificar la captación de Ca²⁺, lo que puede aumentar el estrés oxidativo. En consecuencia, el Ca²⁺ en altas concentraciones puede inducir daños mitocondriales (Gorlach et al., 2015; Simmons y Koester, 1986). La producción de ROS y la

inducción de la apoptosis pueden desencadenarse a través de la captación o liberación neta de Ca^{2+} intracelular desde el retículo endoplásmico (Gorlach *et al.*, 2015).

Nuestros resultados demostraron que la FLX disminuyó la actividad de la acetilcolinesterasa a la concentración de 40 ng L^{-1} el cerebro del pez cebra adulto. Asimismo, Munari *et al.*, 2014 informaron que la FLX ($1 - 5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) disminuyó la AChE en las branquias de *Venerupis philippinarum* después de 7 días de exposición. Asimismo, (González-Rey & Bebianno, 2013) reportaron que la actividad de la AChE en las branquias del mejillón *M. galloprovincialis* fue estimulada después de 3 días de exposición a 75 ng/L . (Mesquita *et al.*, 2011), encontraron que la actividad de AChE en el músculo del cangrejo *Carcinus maenas* se incrementó significativamente después de la exposición a FLX a una concentración de $120 \text{ } \mu\text{g/L}$ durante 7 días. Finalmente, (Hongxing Chen *et al.*, 2018) presentaron un aumento de la actividad AChE en el pez chino *Pseudorasbora parva* expuesto a 0, 50 y $200 \text{ } \mu\text{g/L}$ de FLX durante 4 h de exposición cerebral. Y explica que la alteración de la actividad AChE puede deberse a una disminución de la concentración cerebral de acetilcolina debido a la presencia de FLX.

Finalmente, Farias *et al.*, 2019 demostraron que la actividad de la AChE de los embriones de *D. rerio* se inhibía significativamente a concentraciones ($6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) cercanas a la concentración máxima de FLX reportada en aguas superficiales. Tierney (2011) señaló una disminución de la actividad de la colinesterasa puede causar una miopatía progresiva de los músculos esqueléticos y, en consecuencia, una pérdida de motilidad. Como nuestros resultados mostraron que la exposición de adultos de *D. rerio* a 5, 16, y 40 ng L^{-1} de FLX indujo una ligera disminución de la actividad de AChE y una reducción del comportamiento exploratorio en los peces, sugerimos que la FLX puede causar una miopatía progresiva de los músculos esqueléticos. En resumen, la presencia de FLX puede inducir un aumento de MDA en el cerebro, lo que lleva a la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (ADN) presentes en los diferentes órganos y tejidos del organismo y, en consecuencia, provocar la inhibición de la actividad de la AChE.

Se ha demostrado que la FLX tiene la capacidad de bioacumularse en el cerebro de los peces (Brooks *et al.*, 2009). Por ejemplo, (Grabicova *et al.*, 2014) y (Pan *et al.*, 2018) informaron de que la FLX se bioconcentra en el cerebro de *Oncorhynchus mykiss* ($0.5-1,4 \text{ ng g}^{-1}$) y *Carassius auratus* ($0.1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. Estos resultados son coherentes con los nuestros, en los que se cuantificó la FLX en el cerebro de pez cebra a concentraciones de hasta 3.732 ng g^{-1} .

6.23. Conclusiones

La fluoxetina a concentraciones ambientalmente relevantes (5, 16 y 40 ng L⁻¹) fue capaz de alterar el comportamiento del pez cebra adulto. Estos cambios estaban relacionados con la generación de episodios de ansiedad que eran causados por un aumento de los niveles de serotonina, así como por la formación de ROS. La FLX también indujo una alteración de la actividad de la acetilcolinesterasa por un aumento de las especies reactivas del oxígeno. Los resultados de esta investigación nos llevaron a la conclusión de que la FLX es una sustancia neurotóxica, ya que altera principalmente las funciones neuroendocrinas en el cerebro. Además, existe una fuerte correlación entre los biomarcadores evaluados como el Novel Tank Test (comportamiento), el estrés oxidativo en el cerebro (SOD, CAT, GPX, LPX, POX, HPX), y la actividad AChE (neurotoxicidad).

7.0 Bibliografía

- Aliko, V., Korriku, R.S., Pagano, M., Faggio, C., 2021. Double-edged sword: fluoxetine and ibuprofen as development jeopardizers and apoptosis' inducers in common toad, *Bufo bufo*, tadpoles. *Sci. Total Environ.* 776, 145945.
- Arck, P.C., Slominski, A., Theoharides, T.C., Peters, E.M.J., Paus, R., 2006. Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *J. Investig. Dermatol.* 126 (8), 1697–1704. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700104>.
- Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M.E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., Emmen, H., 2015. From cutting edge to guideline: a first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reprod. Toxicol.* 56, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.06.050>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf.
- 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. *Toxicol. Lett.* 142 (3), 169–183. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00066-3).
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52 (C), 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- Chai, T., Cui, F., Di, S., Wu, S., Zhang, Y., Wang, X., 2021. New insights into cardiotoxicity induced by chiral fluoxetine at environmental-level: enantioselective arrhythmia in developmental zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Pollut.* 270, 116182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116182>.
- Chen, H., Zeng, X., Mu, L., Hou, L., Yang, B., Zhao, J., Schlenk, D., Dong, W., Xie, L., Zhang, Q., 2018. Effects of acute and chronic exposures of fluoxetine on the chinese fish, topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 160, 104–113.

Chu, S., Metcalfe, C.D., 2007. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1163 (1–2), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.014>.

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*. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 109170.

De Abreu, M.S., Maximino, C., Cardoso, S.C., Marques, C.I., Pimentel, A.F.N., Mece, E., Winberg, S., Barcellos, L.J.G., Soares, M.C., 2020. Dopamine and serotonin mediate the impact of stress on cleaner fish cooperative behavior. *Horm. Behav.* 125, 104813. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104813>.

De Assis, H.C.S., Simmons, D.B.D., Zamora, J.M., Lado, W.E., Al-Ansari, A.M., Sherry, J.P., Blais, J.M., Metcalfe, C.D., Trudeau, V.L., 2013. Estrogen-like effects in male goldfish co-exposed to fluoxetine and 17 alpha-ethinylestradiol. *Environ. Sci. Technol.* 47 (10), 5372–5382. <https://doi.org/10.1021/es3044888>.

De Farias, N.O., Oliveira, R., Sousa-Moura, D., de Oliveira, R.C.S., Rodrigues, M.A.C., Andrade, T.S., Domingues, I., Camargo, N.S., Muehlmann, L.A., Grisolia, C.K., 2019. Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos. 215, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.08.009>

Dorelle, L.S., Da Cuña, R.H., Sganga, D.E., Rey Vázquez, G., López Greco, L., Lo Nostro, F.L., 2020. Fluoxetine exposure disrupts food intake and energy storage in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Chemosphere* 238, 124609. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124609>.

Duarte, I.A., Reis-Santos, P., Novais, S.C., Rato, L.D., Lemos, M.F.L., Freitas, A., Pouca, A.S.V., Barbosa, J., Cabral, H.N., Fonseca, V.F., 2020. Depressed, hypertense and sore: longterm effects of fluoxetine, propranolol and diclofenac exposure in a top predator fish. *Sci. Total Environ.* 712, 136564.

Ducharme, N.A., Peterson, L.E., Benfenati, E., Reif, D., McCollum, C.W., Gustafsson, J.Å., Bondesson, M., 2013. Meta-analysis of toxicity and teratogenicity of 133 chemicals from zebrafish

developmental toxicity studies. *Reprod. Toxicol.* 41, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.06.070>.

Elizalde-Velázquez, G.A., Gómez-Oliván, L.M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., Hernández-Navarro, M.D., Galar-Martínez, M., 2021. Antidiabetic drug metformin disrupts the embryogenesis in zebrafish through an oxidative stress mechanism. *Chemosphere* 285, 131213. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131213> ISSN: 0045-6535.

Evans, S.E., Davies, P., Lubben, A., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. Determination of chiral pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and sludge using microwave assisted extraction, solid-phase extraction and chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 882, 112–126. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.039>.

Fernández, Carlos, Carbonell, G., Babín, M., 2013. Effects of individual and a mixture of pharmaceuticals and personal-care products on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in a rainbow trout gonadal cell line (RTG-2). *J. Appl. Toxicol.* 33 (11), 1203–1212. <https://doi.org/10.1002/jat.2752>.

Fernandes, M.J., Paíga, P., Silva, A., Llaguno, C.P., Carvalho, M., Vázquez, F.M., DelerueMatos, C., 2020. Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal. *Chemosphere* 239, 124729. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124729> Epub 2019 Sep 6. PMID: 31526992.

Foley, A.C., Skromne, I., Stern, C.D., 2000. Reconciling different models of forebrain induction and patterning: a dual role for the hypoblast. *Development* 127 (17).

Franzellitti, S., Buratti, S., Capolupo, M., Du, B., Haddad, S.P., Chambliss, C.K., Fabbri, E., 2014. An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat. Toxicol.* 151, 14–26.

Grimes, D.T., Boswell, C.W., Morante, N.F.C., Henkelman, R.M., Burdine, R.D., Ciruna, B., 2016. Zebrafish models of idiopathic scoliosis link cerebrospinal fluid flow defects to spine curvature. *Science* 352 (6291), 1341–1344. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6419>.

Günzler, W.A., Flohé, L., 1985. Glutathione peroxidase. *Handbook Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, pp. 285–290. <https://doi.org/10.1201/9781351072922>.

Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30 (1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2004.06.002>.

Henry, T.B., Black, M.C., 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54 (2), 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9018-0>.

Hermesen, S.A.B., van den Brandhof, E.J., van der Ven, L.T.M., Piersma, A.H., 2011. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicol. in Vitro.* <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.005>.

Hollert, H., Keiter, S., König, N., Rudolf, M., Ulrich, M., Braunbeck, T., 2003. A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Soils Sediments* 3 (3), 197–207. <https://doi.org/10.1065/jss2003.09.085>.

Jiang, Z.-Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202 (2), 384–389. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N).

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.

Kwon, J.W., Armbrust, K.L., 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (10), 2561–2568. <https://doi.org/10.1897/05-613R.1>.

Lajeunesse, A., Smyth, S.A., Barclay, K., Sauvé, S., Gagnon, C., 2012. Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Res.* 46 (17), 5600–5612. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.042>.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. [37] carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346–357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).

Margolis, K.G., Li, Z., Stevanovic, K., Saurman, V., Israelyan, N., Anderson, G.M., Snyder, I., Veenstra-VanderWeele, J., Blakely, R.D., Gershon, M.D., 2016. Serotonin transporter variant drives

preventable gastrointestinal abnormalities in development and function. *J. Clin. Investig.* 126 (6), 2221–2235. <https://doi.org/10.1172/JCI84877>.

Marvanova, M., Gramith, K., 2018. Role of antidepressants in the treatment of adults with anorexia nervosa. *Mental Health Clin.* 8 (3), 127–137. <https://doi.org/10.9740/mhc.2018.05.127>.

Metcalf, C.D., Miao, X.-S., Koenig, B.G., Struger, J., 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2881–2889.

Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247 (10), 3170–3175. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9).

Nakamura, Y., Yamamoto, H., Sekizawa, J., Kondo, T., Hirai, N., Tatarazako, N., 2008. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere* 70 (5), 865–873. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.089>.

Niehrs, C., 2004. Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Development* 131 (6), 425–434. <https://doi.org/10.1038/nrg1347>. Nature Publishing Group.

Nowakowska, K., Giebułtowiec, J., Kamaszewski, M., Adamski, A., Szudrowicz, H., Ostaszewska, T., Solarska-Dzięciołowska, U., Nałęcz-Jawecki, G., Wroczyński, P., Drobniewska, A., 2020. Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: bioaccumulation, physiological and histological changes. *Chemosphere* 250, 108670. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108670>.

OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing.

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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.082>.

Park, J.W., Heah, T.P., Gouffon, J.S., Henry, T.B., Sayler, G.S., 2012. Global gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine and sertraline) reveals unique expression profiles and potential biomarkers of exposure. *Environ. Pollut.* 152, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.039>.

Pereira, A.C., Gomes, T., Ferreira Machado, M.R., Rocha, T.L., 2019. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. *Environ. Pollut.* 252, 1841–1853. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.100> Elsevier Ltd.

Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>.

Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266 (32), 22028–22034. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54740-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54740-2).

Ramirez, A.J., Mottaleb, M.A., Brooks, B.W., Chambliss, C.K., 2007. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79 (8), 3155–3163. <https://doi.org/10.1021/ac062215j>.

Research and Market, 2021. Report: Antidepressants market report 2021: COVID-19 implications and growth to 2030. ID: 5314992. [https://www.researchandmarkets.com/reports/5314992/antidepressants-global-market-report-2021covid?utm_source=dynamic&utm_medium=GNOM&utm_code=mmlpx9&utm_campaign=1380453+-+Global+Antidepressants+Market+\(2020+to+2030\)+-+COVID19+Implications+and+Growth&utm_exec=jamu273gnomd](https://www.researchandmarkets.com/reports/5314992/antidepressants-global-market-report-2021covid?utm_source=dynamic&utm_medium=GNOM&utm_code=mmlpx9&utm_campaign=1380453+-+Global+Antidepressants+Market+(2020+to+2030)+-+COVID19+Implications+and+Growth&utm_exec=jamu273gnomd).

Richards, S.M., Cole, S.E., 2006. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. *Ecotoxicology* 15 (8), 647–656. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0102-4>.

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*). *Aquat. Toxicol.* 183, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.007>.

Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J.-M., 2013. A novel “Integrated biomarker response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (5), 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>.

Schlüsener, M.P., Hardenbicker, P., Nilson, E., Schulz, M., Viergutz, C., Ternes, T.A., 2015. Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the Rhine catchment in the face of climate change. *Environ. Pollut.* 196, 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.09.019>.

Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>.

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 U.S. effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol.* 44 (6), 1918–1925. <https://doi.org/10.1021/es9022706>.

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. *Aquat. Toxicol.* 104 (1–2), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.011>.

Silva, L.J.G., Lino, C.M., Meisel, L.M., Pena, A., 2012. Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: an ecopharmacovigilance approach. *Sci. Total Environ.* 437, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.021> Elsevier.

Slominski, A., Pisarchik, A., Zbytek, B., Tobin, D.J., Kauser, S., Wortsman, J., 2003. Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J. Cell. Physiol.* 196 (1), 144–153. <https://doi.org/10.1002/jcp.10287>.

Soares, J., Coimbra, A.M., Reis-Henriques, M.A., Monteiro, N.M., Vieira, M.N., Oliveira, J.M.A., Guedes-Dias, P., Fontainhas-Fernandes, A., Parra, S.S., Carvalho, A.P., Castro, L.F.C., Santos, M.M., 2009. Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development after full life-cycle parental exposure to low levels of ethinylestradiol. *Aquat. Toxicol.* 95 (4), 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.021>.

Stephenson, M., 2000. Development and validation of the Stephenson multigroup acculturation scale (SMAS). *Psychol. Assess.* 12 (1), 77–88. <https://doi.org/10.1037/1040-3590.12.1.77>.

Stewart, A.M., Cachat, J., Gaikwad, S., Robinson, K.S.L., Gebhardt, M., Kalueff, A.V., 2013. Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in zebrafish. *Neurochem. Int.* 62 (6), 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.018>.

Tenorio-Chávez, P., Cerro-López, M., Castro-Pastrana, L.I., Ramírez-Rodríguez, M.M., Orozco-Hernández, J.M., Gómez-Oliván, L.M., 2020. Effects of effluent from a hospital in Mexico on the

embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Sci. Total Environ.* 727, 138716. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138716>.

Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *1812 (3)*, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.10.011>. Elsevier.

Verlicchi, P., Aukidy, M.A.I., Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—a review. *Sci. Total Environ.* 429. Elsevier, pp. 123–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>

Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H., 2011. Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.004>.

Weinberger, 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). *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.012>.

Writer, J.H., Ferrer, I., Barber, L.B., Thurman, E.M., 2013. Widespread occurrence of neuroactive pharmaceuticals and metabolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters. *Sci. Total Environ.* 461–462, 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.099>.

Xiang, J., Wu, M., Lei, J., Fu, C., Gu, J., Xu, G., 2018. The fate and risk assessment of psychiatric pharmaceuticals from psychiatric hospital effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.049>.

Zhou, L., Cai, M., Ren, Y., Wu, H., Liu, M., Chen, H., Shang, J., 2018. The different roles of 5-HT_{1A/2A} receptors in fluoxetine ameliorated pigmentation of C57BL/6 mouse skin in response to stress. *J. Dermatol. Sci.* 92 (3), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.10.002>.

Zindler, F., Beedgen, F., Brandt, D., Steiner, M., Stengel, D., Baumann, L., Braunbeck, T., 2019. Analysis of tail coiling activity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 186, 109754.

Zodrow, J.M., Stegeman, J.J., Tanguay, R.L., 2004. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 66 (1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.07.002>.

Bibliografia art 2.

Abreu, M.S., Giacomini, A.C.V., Koakoski, G., Oliveira, T.A., Gusso, D., Baldisserotto, B., Barcellos, L.J.G., B015. Effects of waterborne fluoxetine on stress response and osmoregulation in zebrafish. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* D0 (F), J0D–J0J. <https://doi.org/10.1016/Lj.etap.B015.0A.001>.

Airhart, M.J., Lee, D.H., Cilson, T.D., Miller, B.E., Miller, M.N., Skalko, R.G., B00J. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicol. Teratol.* BA (6), 65B–66D. <https://doi.org/10.1016/Lj.ntt.B00J.0J.005>.

Aus Der Beek, T., Ceber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Kister, A., B016. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* <https://doi.org/10.1002/etc.2555>.

Brooks, B.C., Turner, P.K., Stanley, J.K., Ceston, J.J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.C., Huggett, D.B., B00F. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere.* [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)01010F-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)01010F-6).

Brooks, B.C., Huggett, D.B., Boxall, A.B.A., B00A. Pharmaceuticals and personal care products: research needs for the next decade. *Environ. Toxicol. Chem.* BH (1B), BD6A–BDJB. <https://doi.org/10.1016/Hajl0A-FB5.1>.

Caiaffo, V., Oliveira, B.D.R., De S' a, F.B., Ev'encio Neto, J., B016. Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine. *Pharmacol. Res. Perspect.* D (F) <https://doi.org/10.1002/prpB.BF1>.

Castillo-Zacarias, C., Barocio, M.E., Hidalgo-Vazquez, ' E., Sosa-Hernandez, ' J.E., ParraArroyo, L., Lopez-Pacheco, ' I.Q., Barcelo, ' D., Iqbal, H.N.M., Parra-Saldívar, R., B0B1. Antidepressant drugs as emerging contaminants: occurrence in urban and non-urban waters and analytical methods for their detection. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/Lj.scitotenv.B0B0.1DFJBB>.

Chen, Hongxing, Zeng, X., Mu, L., Hou, L., Qang, B., Zhao, J., Schlenk, D., Dong, C., Xie, L., Zhang, P., B01H. Effects of acute and chronic exposures of fluoxetine on the Chinese fish, topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 160, 10D–11F. <https://doi.org/10.1016/Lj.ecoenv.B01H.0D.061>.

Chen, Huihui, Zha, J., Quan, L., Cang, Z., B015. Effects of fluoxetine on behavior, antioxidant enzyme systems, and multixenobiotic resistance in the Asian clam *Corbicula fuminea*. *Chemosphere* 11A, H56–H6B. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.066>.

Connors, D.E., Rogers, E.D., Armbrust, K.L., Kwon, J.-C., Black, M.C., B00A. Growth and development of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and sertraline, throughout metamorphosis. *Environ. Toxicol. Chem.* BH (1B), B6J1–B6J6. <https://doi.org/10.1016/j.etchem.2015.01.011>.

Corcoran, J., Cinter, M.J., Tyler, C.R., B010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit. Rev. Toxicol.* D0 (D), BHJ–F0D. <https://doi.org/10.1080/10409145.2015.1055550>.

Cunha, V., Rodrigues, P., Santos, M.M., Moradas-Ferreira, P., Ferreira, M., B016. Danio rerio embryos on Prozac Effects on the detoxification mechanism and embryo development. *Aquat. Toxicol.* 1JH, 1HB–1HA. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.007>.

De Castro-Catalá, N., Muñoz, I., Riera, J.L., Ford, A.T., B01J. Evidence of low dose effects of the antidepressant fluoxetine and the fungicide prochloraz on the behavior of the keystone freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. *Environ. Pollut.* BF1, D06–D1D. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.011>.

Demidchik, V., B015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.* 10A, B1B–BBH.

Di Poi, C., Evariste, L., Séguin, A., Mottier, A., Pedelucq, J., Lebel, J.-M., Serpentine, A., Budzinski, H., Costil, K., B016. Sub-chronic exposure to fluoxetine in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): uptake and biological effects. *Environ. Sci. Pollut. Res.* BF (6), 500B–501H. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-0100-1>.

Dorelle, L.S., Da Cuna, R.H., Sganga, D.E., Rey Vazquez, G., Lopez Greco, L., Lo Nostro, F.L., B0B0. Fluoxetine exposure disrupts food intake and energy storage in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Chemosphere* BFH, 1BD60A. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.060>. Epub 2015 Aug 11. PMID: 26156060.

Duarte, I.A., Pais, M.P., Reis-Santos, P., Cabral, H.N., Fonseca, V.F., B01A. Biomarker and behavioural responses of an estuarine fish following acute exposure to fluoxetine. *Mar. Environ. Res.* 1DJ, BD–F1. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.002>.

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., B00A. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* B05 (1), FH–DD. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.033>.

Erkan Ozcan, M., Gulec, M., Ozerol, E., Polat, R., Akyol, O., B00D. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 1A (B). <https://journals.lww.com/IntClinPsychopharmacol/Fulltext/2016/07/01/AntioxidantEnzymeActivitiesAndOxidativeStress.aspx> .

Farias, N., Oliveira, R., Sousa-Moura, D., Oliveira, R., Rodrigues, M., Andrade, T., Domingues, I., Camargo, N., Muehlmann, L., B01H. Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* B15 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.08.001>.

Franzellitti, S., Buratti, S., Capolupo, M., Du, B., Haddad, S.P., Chambliss, C.K., Brooks, B. C., Fabbri, E., B01D. An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat. Toxicol.* 151, 1D–B6. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.016>.

Gerhardt, A., B00J. Aquatic behavioral ecotoxicology—prospects and limitations. *Hum. Ecol. Risk Assess.: Int. J.* 1F (F), DH1–DA1. <https://doi.org/10.1080/10807019.2016.1191111>.

Goldberg, J.I., Mills, L.R., Kater, S.B., 1AAB. Effects of serotonin on intracellular calcium in embryonic and adult *Helisoma* neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 10 (D), B55–B6D. [https://doi.org/10.1016/j.jf6-5jdh\(ab\)2016.01.001](https://doi.org/10.1016/j.jf6-5jdh(ab)2016.01.001).

Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., B01F. Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environ. Pollut.* 171, B00–B0A. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.018>.

Gorlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanova, O., B015. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biol.* 6, B60–BJ1. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.08.010>.

Grabicova, K., Lindberg, R.H., Ostman, M., Grabic, R., Randak, T., Joakim Larsson, D.G., Fick, J., B01D. Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant. *Sci. Total Environ.* DHH–DHA, D6–50. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.058>.

Haghani, S., Karia, M., Cheng, R.-K., Mathuru, A.S., B01A. An automated assay system to study novel tank induced anxiety. *Front. Behav. Neurosci.* 1F, 1H0. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00110>.

Hellou, J., B011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 1H (1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0F6J-B>.

Hird, C.M., Grbina, M.A., Lewis, C.N., Snape, J.R., Galloway, T.S., B016. Fluoxetine exhibits pharmacological effects and trait-based sensitivity in a marine worm. *Environ. Sci. Technol.* 50 (15), HFDD–HF5B. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01611>.

Hossain, M.S., Buřić, M., Moore, P.A., B0B0. Exposure paradigm of fluoxetine impacted the *Faxonius virilis* agonistic behavior differently. *Science of the Total Environment* 6AA, 1FDF00.

Lazzara, R., Blazquez, M., Porte, C., Barata, C., B01B. Low environmental levels of fluoxetine induce spawning and changes in endogenous estradiol levels in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 106–10J, 1BF–1F0. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.001>.

Lopez-Serna, R., Kasprzyk-Hordern, B., Petrović, M., Barcelo, D., B01F. Multi-residue enantiomeric analysis of pharmaceuticals and their active metabolites in the Guadalquivir River basin (South Spain) by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* <https://doi.org/10.1007/s00216-017-6A00-J>.

Martin, J.M., Nagarajan-Radha, V., Tan, H., Bertram, M.G., Brand, J.A., Saaristo, M., Dowling, D.K., Cong, B.B.M., B0B0. Antidepressant exposure causes a nonmonotonic reduction in anxiety-related behaviour in female mosquitofsh. *J. Hazard. Mater. Lett.* 1, 10000D <https://doi.org/10.1016/j.hazl.2017.10.000>.

Maximino, C., Van Der Staay, F.J., B01A. Behavioral models in psychopathology: epistemic and semantic considerations. *Behav. Brain Funct.* 15 (1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12928-017-015B-D>.

Mceachran, A.D., Hedgespeth, M.L., Newton, S.R., McMahan, R., Strynar, M., Shea, D., Nichols, E.G., B01H. Comparison of emerging contaminants in receiving waters downstream of a conventional wastewater treatment plant and a forest-water reuse system. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1505-5>.

Nielsen, S.V., Frausing, M., Henriksen, P.G., Beedholm, K., Baatrup, Erik, B01A. The psychoactive drug escitalopram affects foraging behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem. FH (A)*, 1A0B–1A10. <https://doi.org/10.1002/etc.2222>.

Ofoegbu, P.G., Lourenço, J., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., Pestana, J.L.T., B01A. Effects of low concentrations of psychiatric drugs (carbamazepine and fluoxetine) on the freshwater planarian, *Schmidtea mediterranea*. *Chemosphere* B1J, 5DB–5DA. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.111>.

Pan, C., Qiang, M., Xu, H., Xu, B., Jiang, L., Cu, M., B01H. Tissue bioconcentration and effects of fluoxetine in zebrafish (*Danio rerio*) and red crucian carp (*Carassius auratus*) after short-term and long-term exposure. *Chemosphere* B05, H–1D. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.011>.

Peterson, E.K., Buchwalter, D.B., Kerby, J.L., Lefauve, M.K., Varian-Ramos, C.C., Swaddle, J.P., B01J. Integrative behavioral ecotoxicology: bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and conservation. *Curr. Zool.* 6F (B), 1H5–1AD. <https://doi.org/10.1016/j.ccz.2010.09.001>.

Regoli, F., Giuliani, M.E., B01D. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* AF, 106–11J. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.09.006>.

Sanchez-Argüello, P., Fernández, C., Tarazona, J.V., B00A. Assessing the effects of fluoxetine on *Physa acuta* (Gastropoda, Pulmonata) and *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera) using a two-species water–sediment test. *Sci. Total Environ.* D0J (6), 1AFJ–1AD6. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.001>.

Simmons, L.K., Koester, J., 1AH6. Serotonin enhances the excitatory acetylcholine response in the RB cell cluster of *Aplysia californica*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 6 (F), JJD–JH1. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-0F-00JJD.2010.10.011>.

Stewart, A.M., Gilman, J.F.P., Norton, C.H.J., Parker, M.O., Brennan, C.H., Gerlai, R., Kalueff, A.V., B015. Molecular psychiatry of zebrafish. *Mol. Psychiatry* B0 (1), B–1J. <https://doi.org/10.1016/j.molps.2010.10.011>.

Tierney, K.B., B011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish (<https://doi.org/>). *Biochim. Et. Biophys. Acta BBA Mol. Basis Dis.* 1H1B (F), FH1–FHA. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.10.011>.

Weinberger, J., Klaper, R., B01D. 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). *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.01.018>.

Zindler, F., Beedgen, F., Brandt, D., Steiner, M., Stengel, D., Baumann, L., Braunbeck, T., B01A. Analysis of tail coiling activity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116, 10A5D <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.055>.

Zindler, F., Stoll, S., Baumann, L., Knoll, S., Huhn, C., Braunbeck, T., B0B0. Do environmentally relevant concentrations of fluoxetine and citalopram impair stress-related behavior in zebrafish (*Danio rerio*) embryos? *Chemosphere* 116, 1B5F. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.058>.

Zindler, F., Tisler, S., Loerracher, A.-K., Zwiener, C., Braunbeck, T., B0B0. Norfluoxetine is the only metabolite of fluoxetine in zebrafish (*Danio rerio*) embryos that accumulates at environmentally relevant exposure scenarios. *Environ. Sci. Technol.* 44 (J), DB00–DB0A. <https://doi.org/10.1021/lacs.est.100000a>.

Abajo F J, Del Pino A, García del Pozo J (2005). Evolución de la utilización de antiinflamatorios no esteroideos en España. *Aten Primaria* pag; 36:424-433.

Alloway BJ, Ayres DC. 1993. Chemical principles of environmental pollution. Chapman and Hall. London 395 p.

Ali S, van Mil HG, Richardson MK (2011) Evaluación a gran escala del embrión de pez cebra como un posible modelo predictivo en las pruebas de toxicidad. *PLoS One* 6: e21076 [CrossRefGoogle Scholar](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021076)

Arellano-Aguilar, O., Montoya, R. M. Ortega E. L. (2013). Danos a la Salud por Efectos Ambientales: Morbilidad y Mortalidad en la Población Mexicana; en *Salud, Ambiente y Trabajo*, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. Mc Graw Hill (en imprenta)

Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M., 1993 “Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging” Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 90, 7915-7922.

Andrews NC. Disorders of iron metabolism. N Engl J Med. 1999 Dec 23;341(26):1986-95.

André Lajeunesse, Cristian Gagnon, Francois Gagné, Séverine Louis, Patrick Cejka, Sébastien Sauvé. Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – Evidence of biological effects. Chemosphere (2011), 83:564-571.

Barcelo, L.D., y Lopez, M. J., 2007 Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico-Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.

Barry, M.J. (2013) Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. *Ecotoxicology*. **22**(2), 425–432.

Becerra---Herrera,M., Honda, L., & Richter, P. (2015). Ultra---high---performance liquid chromatography—Time---of---flight high-resolution mass spectrometry to quantify acidic drugs in wastewater. *Journal of Chromatography A*, 1423, 96---103.

Boxxal, A.B.A., Kolpin, D.W., Halling-Sorensen, B. y Tolls, J. (2003) Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol*, **37**(15), 287-294.

Buy Maria C. ING, Beatriz Martin, Carmen E. Miranda, Irma Torrejon, Teresa Garrot. prevalencia de anemia y deficiencia de hierro en escolares jujeños de 12 años. medicina. 2005;65:126-30.

Burcham PC. Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: a new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007;56(1):18-22.

Bringolf, R.B., Heltsley, R.M., Newton, T.J., Eads, C.B., Fraley, S.J., Shea, D. y Cope, W.G. (2010) Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environ. Toxicol. Chem*. **29**(6), 1311-1318.

Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W. y Hugget, D.B. (2003) Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere* **52**(1), 135–142.

Carballo M, De la Torre A, Ñuñoz J (2004). Curso sobre toxicología y seguridad química. Sanidad Ambiental. CISA Madrid.

Carney Almroth B, Albertsson E, Sturve J, Forlin L. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2008 Jul;70(3):370-8.

Campos, B., Piña, B. y Barata, C. (2012) Mechanisms of action of selective serotonin reuptake inhibitors in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol*. **46**(5), 2943–2950.

Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K.M., Wu, N., Wong, K., Roy, S., Suci, C., Goodspeed, J., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Tan, J., Denmark, A., Gilder, T., Kyzar, E., DiLeo, J., Frank, K., Chang, K., Utterback, E., Hart, P., Kalueff, A.V., 2010.

Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat. Protocols* 5, 1786e1799.

CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. Agua. Disponible en: <http://www.cna.gob.mx> (citado 19/05/2015).

Elisa Pietracchi, Ana-María Bermejo, Iván Álvarez, Pamela Cabarcos, Walter Balduini, María-Jesús Tabernero. Simultaneous determination of new-generation antidepressants in plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Toxicology* (2013), 31:124-132.

Estrada, E.B., Cortés, J.E., González, A., Calderón, C.G., Rivera, M., Ramírez, E., Montellano, L., Gelover, S.L., Pérez, S., Cardoso, L., Martín, A. Y García, L. (2016) Assessment of full-scale biological nutrient removal systems upgraded with physico-chemical processes for the removal of emerging pollutants present in wastewaters from Mexico. . *Sci Total Environ.* **571**, 1172-1182.

Evans, S.E., Davies, P., Lubben, A. y Kasprzyk- Horden. B. (2015) Determination of chiral pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and sludge using microwave assisted extraction, solid-phase extraction and chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **882**, 112-126.

Fabbri E (2015) Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1340:20–28.

Flaherty, C.M. y Dodson, S.I. (2005) Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* **61**(2), 200–207.

Fent K, Weston A, Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76: 122–159.

Felix–Canedo, T. E., Duran–Alvarez, J. C., & Jimenez–Cisneros, B. (2013). The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Science of the Total Environment*, 454, 109-118.

Fernández. C., González- Doncel, M., Pro, J., Carbonell, G. y Tarazona, J.V. (2010) Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the henares-jarama-tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. *Sci Total Environ.* **408**(3), 543–551.

Foran, C.M., Weston, J., Slattery M., Brooks, B.W. y Hugget, D.B. (2004) Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Arch Environ Contam Toxicol.* **46**(4):511-517.

García-Carrasco M, Ivorra J, Rosas J, Santos G (2005). Aintiinflamatorios no esteroideos. En: Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Rosas J, editores. Enfermedades autoinmunes sistémicas y reumatológicas. Barcelona: Ed. Masson p. 775-792.

Giebultowicz, J. y Nalecz-Jawecki, G. (2014) Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata Rivers and in tap water in Warsaw (Poland). *Ecotoxicol Environ Saf.* **104**,103-9.

González-Rey, M., Tapie, N., Le Menach, K., Dévier, M.H., Budzinski, H. y Bebianno, M.J. (2015) Occurrence of pharmaceutical compounds and pesticides in aquatic systems. *Marine Pollution Bulletin*. **96**(1-2), 384-400.

Gonzalez---Gonzalez, E. D., Gomez---Olivan, L. M., Galar -Martinez, M., Vieyra---Reyes, P., Islas-- Flores, H., Garcia- -Medina, S., Jimenez---Vargas, J. M., Razo---Estrada, C., & Perez--- Pasten, R. (2014). Metals and nonsteroidal anti---inflammatory pharmaceuticals drugs present in water from Madin Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood, and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, *67*(2), 281---295.

González E D (2013). Evaluación de la toxicidad inducida por antiinflamatorios no esteroideos presentes en agua de la presa Madín sobre *Cyprinus carpio*. *Tesis de maestría*. Facultad de Química UAEM México.

Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Hopkins, N. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nature genetics*, *31*(2), 135–40. doi:10.1038/ng896

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. a, ... Nusslein Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development (Cambridge, England)*, *123*, 1–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007226>

Harirforoosh, S., Asghar, W., & Jamali, F. (2013). Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*, *16*(5), 821-847.

Hiriart, M.M. El agua como recurso. UNAM. Disponible en:<http://www.comoves.unam.mx/assets/revista/54/el-agua-como-recurso.pdf> (citado 12/05/2015).

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Turrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Matthews, L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498–503. doi:10.1038/nature12111

Iyengar. KMNyV. Iron content, bioavailability & factors affecting iron status of Indias. *Indian Journal Med Research*. 2009;130:634-45.

Jaquenod de Zsögön, S. (2007). *Vocabulario ambiental práctico*. Dykinson. Madrid, p.p. 46.

Jones O, Voulvoulis N, Lester J. 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, *36*: 5013-5022.

Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem*. 1992;202(2):384-9.

Kimmell, C. B., Ballard, W. W., Kimmell, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, *203*(3), 253–310. doi:10.1002/aja.1002030302

Kreke, N., y Dietrich, D.R. (2008) Physiological endpoints for potential SSRI interactions in fish. *Crit Rev Toxicol.***38**(3), 215-47.

Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol.* 2008 Jul;88(1):7-15.

Lam, D., Gorman, D.A., Patter, S. y Pringsheim, T. (2013) The pharmacoepidemiology of selective serotonin reuptake inhibitors for children and adolescents in Canada from 2005 to 2009: a database analysis. *Pediatr Drugs.* **15**(4), 319–327.

Laine, L. (2001). Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high-risk patient. *Gastroenterology*, 120(3), 594-606.

Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1-4), 1–20. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.077

Liliana J. G. Silva, André M.P.T. Pereira, Leonor M. Meisel, Celeste M. Lino, Angelina Pena. Reviewing the serotoning reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: Uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. *Environmental Pollution* (2015), 197.127- 143.

Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J. y Van Der Kraak, G. (2009) Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation. *Aquat Toxicol.* **95**(4), 320–329.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994;233:346-57.

McDonald, M.D., González, A. y Sloman, K.A. (2011) Higher levels of aggression are observed in socially dominant toadfish treated with the selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.***153**(1), 107–112.

Maximino, C., Brito, T.M., Dias, C.A.G.D.M., Gouveia Jr., A., Morato, S., 2010. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat. Protocols* 5, 209e216.

Menningen, J.A., Stroud, P., Zamora, J.M., Moon, T.W. and Trudeau, V.L. (2011) Pharmaceuticals as neuroendocrine disruptors: Lessons learned from fish on Prozac. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.*, **14** (5-7), 387-412.

Mossner, R. y Lesch, K.P. (1998) Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun.***12**(4), 249-71.

MS Hasan, R. Kayesh , F. Begum , SMA Rahman. Complejos de metales de transición de naproxeno: síntesis, caracterización, estudios de degradación forzada y verificación de métodos analíticos *J Anal Method Chem* , 2016 (2015).

Matozzo V (2016) Assessing the Effects of Amoxicillin on Antioxidant Enzyme Activities, Lipid Peroxidation and Protein Carbonyl Content in the Clam *Ruditapes philippinarum* and the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *ISJ-Invertebr Surviv J* 97:521–527.

Mayor Oxila, R., 2010 “Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante” *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 5(2), 23-29.

Meek, I. L., Van de Laar, M. A. & Vonkeman, H (2010). Non-steroidal anti-inflammatory drugs: an overview of cardiovascular risks. *Pharmaceuticals*, 3(7), 2146-2162.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-5.

Neuwoehner, J., Fenner, K. y Escher, B.I. (2009) Physiological modes of action fluoxetine and its human metabolites in algae. *Environ. Sci. Technol.* **43**(17), 6830–6837.

Nishi, I., Kawakami, T., & Onodera, S. (2015). Monitoring the concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-inhibiting activities in the surface waters of the Tone Canal and Edo River Basin. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 50(11), 1108--1115.

Park, J.W., Heah, T.P., Gouffon, J.S., Henry, T.B. y Sayler, G.S. (2012) Global gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine and sertraline) reveals unique expression profiles and potential biomarkers of exposure. *Environ Pollut.* **167**,163-170.

Parvez S, Raisuddin S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ Toxicol Pharmacol.*2005;20(1):112-7.

Petrovic M, Sole M, de Alda MJL, Barcelo D (2002^a) *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2146.

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*. 1991;266(32):22028-34.

Rocha, P. S., Bernecker, C., Strecker, R., Mariani, C. F., Pompeo, M. L. M., Storch, V., ... Braunbeck, T. (2011). Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tiete River Basin (Sao Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(7), 1951–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.07.009

Rodríguez J., Méndez J., Trujillo Y., 2001 “Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo” *Revista Médica Cubana Militar*, 30(1), 34-44.

Sarah M.R. Wille, Kristof E. Maudens, Carlos H. Van Peteghem, Willy E.E. Lambert. Development of a solid phase extraction for 13 “newgeneration antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A* (2005), 1098:19-29.

Sarah M.R. Wille, Kristof E. Maudens, Carlos H. Van Peteghem, Willy E.E. Lambert. Development of a solid phase extraction for 13 “newgeneration antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A* (2005), 1098:19-29.

Sarah M. R. Wille, Paul Van Hee, Hugo M. Neels, Carlos H. Van Peteghem, Willy E. Lambert. Comparison of electron and chemical ionization modes by validation a quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of new generation antidepressants and their active metabolites in plasma. *Journal of Chromatography A* (2007), 1176:236-245.

Sara M. R. Wille, Els A. De letter, Michel H. A. Piette, Lien K. Van Overschelde, Carlos H. Van Peteghem, Willy E. Lambert. Determination of antidepressants in human postmortem blood, brain tissue, and hair using gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Legal Medicine* (2009), 123:451-458.

SAGAN. Contaminación del agua. Disponible en:http://www.sagangea.org/hojared_AGUA/paginas/17agua.html (citado 12/05/2015).

Styrishave, B., Halling-Sorensen, B. y Ingerslev, F. (2010) Environmental risk assessment of three selective serotonin reuptake inhibitors in the aquatic environment: A case study including a cocktail scenario. *Environ Toxicol Chem.* **30**(1):254-261.

Tanwar, S., Di Carro, M., & Magi, E. (2015). Innovative sampling and extraction methods for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *106*, 100-106.

Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ, Vaquero MP. [Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health]. *Nutr Hosp.* 2010 May-Jun;25(3):350-65.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208.

Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., & Sekizawa, J. (2009). Persistence and partitioning of eight-selected pharmaceuticals in the aquatic environment: laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water research*, *43*(2), 351-362.

Weinberger II, J. y 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). *Aquat Toxicol.* *151*, 77-83.