



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas -
Programa de Magister en Ciencias mención Oceanografía

**Efectos de la exposición a ácido okadaico y variaciones
ambientales sobre mecanoreceptores de larvas tempranas
de anchoveta (*Engraulis ringens*)**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias mención
Oceanografía

POR PIERA ANDREA PEPE VARGAS
CONCEPCIÓN-CHILE
2024

Profesores Guía: Dr. Leonardo Castro Cifuentes
Dra. Alejandra Llanos Rivera
Dpto. de Oceanografía, Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado

La Tesis de “*Magister en Ciencias mención Oceanografía*” titulada “*Efectos de la exposición a ácido okadaico y variaciones ambientales sobre mecanorreceptores de larvas tempranas de anchoveta (Engraulis ringens)*”, de la Srta. Piera Andrea Pepe Vargas y realizada bajo la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dr. Leonardo Castro Cifuentes
Profesor Guía
Universidad de Concepción

Dra. Alejandra Llanos Rivera
Profesora Co-Guía
Universidad de Concepción

Dr. Mauricio Urbina Foneron
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción

Dr. Gemita Pizarro Nova
Evaluador Externo
Instituto de Fomento Pesquero (IFOP)

Dr. Diego Narvaez Rodriguez
Director
Programas de Postgrados en Oceanografía
Universidad de Concepción

A Renzo Pepe Victoriano, el gran pez.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dirección de Posgrado de la Universidad de Concepción y al Centro de Investigación COPAS COASTAL que durante el desarrollo de esta tesis y a través de sus programas de becas ayudaron al financiamiento de mi investigación, gracias por brindarme la oportunidad de hacer ciencia de alta calidad.

Junto a ellos agradezco a la grandiosa tripulación de la Kay Kay II por acompañarme en cada una de mis salidas a terreno y por cuidarme cada vez que el frío y las olas me jugaban malas pasadas, gracias Sergio, Antonio, Mario y don Iván, la aventura del terreno no habría sido lo mismo sin ustedes. Al equipo del Laboratorio de Oceanografía Pesquera y Ecología Larval (LOPEL) que me acogió y apoyó durante cada recolección de material, que se turnaban para acompañarme en la embarcación y que confiaron en mi trabajo desde el primer momento en que se los mostré, a Pamela por su contención, a Carlos, Horacio y Roxana por su experiencia y a Cecilia y Valeria por permitirme enseñarles y aprender sobre esto que me apasiona. Con igual cariño agradezco al equipo del Laboratorio de Toxicología Acuática (LATAC) por su cariño, amistad y apoyo en todas las etapas de esta investigación, sobre todo a Nicolás por sus empujones de ánimo. Agradezco enormemente a Patricio Yáñez, mi compañero de experimentos y de ciencia, ¡qué distinto habría sido atravesar esta etapa sin tu compañía querido amigo!, siento que nunca te he agradecido lo suficiente por todo lo que aguantaste al acompañarme en esta tesis, que quede escrito que nada de esto sería posible sin tu apoyo y tu trabajo.

A mis profesores guía el Dr. Leonardo Castro y la Dra. Alejandra Llanos, muy pocos estudiantes tenemos la suerte de contar con profesores guía tan preocupados y dedicados a su labor como ustedes. Gracias por todo lo enseñado en oceanografía, en ciencia y en la vida. Gracias también a la Dra. Allisson Astuya que facilitó el uso del microscopio de epifluorescencia con el que pude realizar mis mediciones y por siempre estar dispuesta a ayudar y a sorprenderse con cada avance en mi trabajo y a la Dra. Catharina Alves por su guía en el análisis de datos, gracias por contagiarme de su pasión cuando me sentí desmotivada y pasar horas hablando sobre la mejor forma de presentar mis resultados.

Finalmente agradezco a mi círculo personal de amistad, amor y contención: a mi amiga Victoria Alfaro, no sé si decir que estoy aquí gracias a ti o por tu culpa, sea como fuese

tu presencia incondicional ha marcado de maravillosa forma mi camino como científica, a Ipa, que jamás leerás estas palabras porque eres un gato pero poco se habla de cuantos análisis, cuántas tardes de redacción y cuantas noches de oceanografía has vivido, a Francisco por tomar mi mano y no soltarla nunca en este periodo de amor y caos científico, y a mi familia, que desde lejos, han logrado acompañar y ser un refugio seguro para mi vida en la academia, gracias a Andrea, la estrella más brillante del cielo, y a Renzo, el gran pez, que cultivaron mi amor por el océano, y a mis hermanos y hermanas, Renzo, Franco, Giulia, Alessandra y Tamara, no espero entiendan mi amor por lo que hago, pero espero puedan disfrutar conmigo la alegría que me da amarlo.

Seguramente quedaron nombres en el tintero, podría escribir páginas y páginas de nombres de amigos, familiares, profesores, compañeros, colegas... gracias por su paciencia, motivación y palabras de aliento en los momentos más desafiantes. Su confianza en mí y en mi trabajo ha sido un verdadero motor para alcanzar este logro, espero poder corresponder a su generosidad con éxitos en el futuro.

Índice de contenidos

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1.- INTRODUCCIÓN	4
1.1 Floraciones algales nocivas (FAN): toxinas lipofílicas y ácido okadaico.	4
1.2 Larvas de anchoveta (<i>Engraulis ringens</i>) como modelo de estudio.	7
1.3 Impacto de las variaciones ambientales y biotoxinas sobre órganos mecanosensoriales: Evaluación a través del estudio de neuromastos de organismos marinos.	7
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Descripción del área de estudio	11
3.2 Obtención del material biológico:	12
3.3 Primer set de experimentos: Estandarización de métodos.	13
3.3.1 Estandarización del conteo de células de neuromastos como método de evaluación de daño.	13
3.3.2 Evaluación de rangos de concentraciones de ácido okadaico (AO) que inducen alteraciones sobre los neuromastos.	17
3.4 Segundo set de experimentos: Evaluación de variaciones de temperatura, salinidad y ácido okadaico sobre los neuromastos de larvas de anchoveta.	17
3.5 Análisis estadísticos	18
4.- RESULTADOS	20
4.1 Descripción del área de estudio	20
4.2 Estandarización de conteo de células de neuromastos: evaluación de CuSO ₄ como control positivo de daño en células de neuromastos.	22
4.3 Evaluación de rangos de concentraciones de ácido okadaico (AO) que inducen alteraciones sobre los neuromastos.	23
4.4 Evaluación de daño generado por variaciones de temperatura y salinidad sobre neuromastos de larvas de anchoveta.	24
4.5 Evaluación del efecto de AO con variaciones de temperatura y salinidad ambiental en los neuromastos de larvas de anchoveta.	26

5.- DISCUSIÓN	32
6.- CONCLUSIONES	39
Referencias	40

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura química del Ácido Okadaico	5
Figura 2: A. Esquema de un neuromasto, que ilustra los diferentes tipos de células implicadas y su organización. B. Esquema de una célula ciliada, que ilustra su asimetría funcional..	9
Figura 3: Área de estudio. Bahía Coliumo	11
Figura 4: Estadíos de <i>Engraulis ringens</i> observados durante la incubación.	14
Figura 5: A. Esquema de disposición de neuromastos (L1 a L7) en el cuerpo de una larva de anchoveta. B. Visualización in vivo de sección media del cuerpo de larva de anchoveta expuesta a agua de mar (control negativo) y teñida con DiAsp bajo microscopio (400x).	16
Figura 6: Perfiles de temperatura y salinidad para el área de estudio durante muestreos realizados en septiembre y octubre	21
Figura 7: Número promedio de células viables de neuromastos laterales 3, 4, 5 de larvas de anchoveta en tratamientos control positivo (CuSO_4) y negativo (agua de mar)	22
Figura 8: Evaluación del efecto de concentraciones crecientes de AO en células de neuromastos.	23
Figura 9: Efecto de diferentes combinaciones de temperatura y salinidad (tratamientos) en el número de células viables de neuromastos de larvas de anchoveta en los tres experimentos realizados.	26
Figura 10: Efecto del AO y diferentes combinaciones de temperatura y salinidad en el número de células viables de neuromastos..	28

Índice de tablas

Tabla 1: Detalle de embarques: Muestreos y destino del material biológico	13
Tabla 2: Matriz de comparaciones múltiples (T. Tukey)	24
Tabla 3: Matriz de comparaciones múltiples (T. Dunn) por experimento..	29

RESUMEN

El impacto de las toxinas marinas producidas por floraciones algales, como el ácido okadaico (AO), en combinación con variaciones ambientales como la temperatura y la salinidad sobre organismos de la columna de agua, es un campo poco explorado pero de gran relevancia ecológica. Especies pelágicas de importancia comercial como la anchoveta (*Engraulis ringens*) pueden estar expuestas a estos factores en un escenario de cambio climático, que no solo afecta las condiciones normales de temperatura y salinidad en la columna de agua, sino que también aumenta la probabilidad de floraciones algales de especies productoras de estas toxinas y, por ende, aumenta la probabilidad de que esta especie de pez pueda entrar en contacto con las biotoxinas producidas durante estos eventos.

En este estudio, se evaluó la integridad de las células ciliadas de órganos mecanosensoriales presentes en larvas de peces (llamados neuromastos), ante la exposición por inmersión a distintas combinaciones de AO (1 ng/mL), temperatura (12 y 14°C) y salinidad (32 y 34 PSU). Para estas evaluaciones se realizó el conteo de células ciliadas viables en neuromastos específicos usando tinciones vitales en larvas con saco vitelino de anchoveta provenientes de huevos recolectados en la zona de desove en la región del Biobío frente a Bahía Coliumo. El análisis de los resultados mostró un efecto significativo en el número promedio de células ciliadas viables por neuromasto asociado a ciertos tratamientos. En primer lugar, se observó una disminución significativa (Test de Dunn $p=0.0161$; $p=0.0019$) en la integridad de estos órganos en respuesta a cambios en la salinidad del entorno con un menor número de células en el tratamiento de 32 PSU respecto a las condiciones normales (34 PSU, 12°C); además de una variación estacional asociada al avance del periodo reproductivo de la especie (promedio inicial (septiembre): 7,4 células viables; final (diciembre): 4,4 células viables). Se evidenció también, un efecto combinado de la exposición a AO y los parámetros ambientales, con una disminución significativa en la cantidad de células ciliadas viables en la mayoría de las combinaciones probadas, evidenciándose el daño influenciado por la toxina, junto con un papel sinérgico y/o aditivo de la temperatura. Estos hallazgos, que demuestran cómo la acción de AO sobre los neuromastos aumenta por factores ambientales, resaltan la importancia de considerar múltiples factores al estudiar los efectos de las toxinas marinas en larvas de peces y su supervivencia en el ambiente, proporcionando una nueva perspectiva

sobre cómo estas toxinas pueden interactuar con elementos abióticos y afectar a los organismos que coexisten en la columna de agua.

ABSTRACT

The impact of marine toxins produced by algal blooms, such as okadaic acid (OA), in combination with environmental variations such as temperature and salinity, on organisms in the water column, is a field that is poorly explored but of great ecological relevance. Pelagic species of commercial importance such as the anchoveta (*Engraulis ringens*) may be exposed to these factors in a scenario of climate change, which not only affects the normal conditions of temperature and salinity in the water column but also increases the probability of algal blooms of species producing these toxins and therefore increases the likelihood of these fish species coming into contact with the biotoxins produced during these events.

In this study, the integrity of ciliated cells of neuromasts, mechanosensory organs present in fish larvae, was evaluated under immersion exposure to different combinations of OA (1 ng/mL), temperature (12 and 14°C), and salinity (32 and 34 PSU). For these evaluations, the count of viable ciliated cells in specific neuromasts was performed using vital stains in yolk-sac anchoveta larvae collected from eggs spawned in this species spawning area in the Biobío region off Bahía Coliumo. The analysis of the results showed a significant effect on the average number of viable ciliated cells per neuromast associated with certain treatments. Firstly, a significant decrease (Dunn's test $p=0.0161$; $p=0.0019$) in the integrity of these organs was observed in response to changes in environmental salinity, with a lower number of cells in the 32 PSU treatment compared to normal conditions (34 PSU; 12°C). Additionally, a seasonal variation associated with the advancement of the species' reproductive period was evidenced (Initial average (September): 7.4 viable cells; final (December): 4.4 viable cells). A combined effect of OA exposure and environmental parameters was also evident, with a significant decrease in the quantity of viable ciliated cells in most of the tested combinations, indicating damage influenced by the toxin, along with a synergistic and/or additive role of temperature. These findings, demonstrating how the action of OA on neuromasts is enhanced by environmental factors, highlight the importance of considering multiple factors when studying the effects of marine toxins on fish larvae and their survival in the environment, providing a new perspective on how these toxins may interact with abiotic elements and affect organisms coexisting in the water column.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Floraciones algales nocivas (FAN): toxinas lipofílicas y ácido okadaico.

Durante eventos de floraciones algales nocivas (FAN) ocurre una proliferación excesiva de microalgas producto de condiciones ambientales favorables para su crecimiento en la columna de agua. En los últimos años, se ha observado un aumento mundial en la frecuencia de FAN (Anderson et al., 2015; Kim, 2006; Trainer et al., 2020), por lo tanto, identificar las especies de microalgas involucradas y comprender sus impactos ambientales se ha convertido en una preocupación abordada desde diversas disciplinas. Entre los organismos que pueden prosperar durante un evento de FAN se encuentran las microalgas productoras de biotoxinas, que, junto a las propias biotoxinas, se han convertido en objeto de investigación reciente (Anderson et al., 2021; Christensen & Khan, 2020). Por ejemplo, se ha observado que las variaciones en los parámetros fisicoquímicos de la columna de agua, como la temperatura y la salinidad, pueden alterar la frecuencia, intensidad y duración de estas FAN, así como la producción de toxinas asociadas (Basti et al., 2018; Hinder et al., 2012; Kibler et al., 2015). Estas observaciones resultan relevantes en el contexto de los cambios globales actuales, como el calentamiento global y la contaminación costera. Se prevé que estos cambios provoquen un aumento tanto en la periodicidad y en la cobertura geográfica en la que se desarrollan las FAN; pudiendo incluso ocurrir en lugares donde antes no se reportaban (Wells et al. 2020; Glibert et al. 2014).

En las costas chilenas, se ha reportado la presencia de biotoxinas, de tres grupos que, en función de su toxicidad, se denominan: toxinas paralizantes, toxinas amnésicas o toxinas lipofílicas (antiguamente llamadas toxinas diarreicas de mariscos por sus efectos en la salud humana). Las toxinas lipofílicas son producidas por especies de dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum* y corresponden a compuestos poliéteres entre los que se encuentran el ácido okadaico (OA) y sus análogos las dinofisistoxinas (DTXs), así como las pectenotoxinas (PTX), yessotoxinas (YTX) y azaspirácidos (AZA) (Miles et al., 2004; Paz et al., 2004; Tillman et., 2009; Sar et al., 2002). En particular, el ácido okadaico (AO; Figura 1) posee una estructura de poliéter cíclico de 38 carbonos, altamente lipofílica, lo que le confiere una baja polaridad, fuerte hidrofobicidad y alta estabilidad en la columna de agua (Zhao et al. 2016).

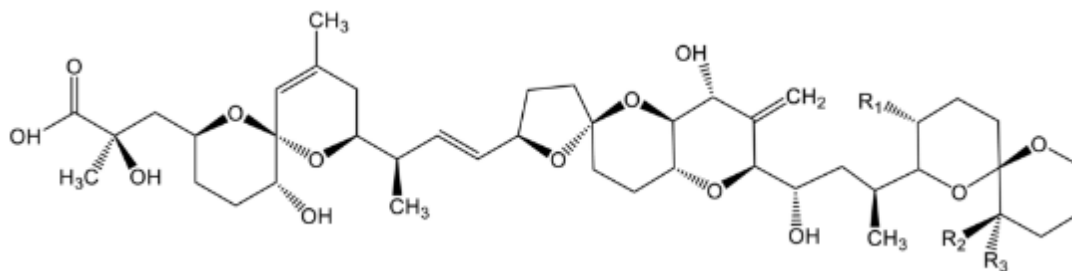


Figura 1: Estructura química del Ácido Okadaico. (Extraído de Louzao et al. 2022)

El mecanismo de acción del AO se fundamenta en la acción inhibitoria sobre las proteínas-fosfatasa PP1 y PP2A, involucradas en reacciones de desfosforilación relevantes a nivel sistémico. Entre otros procesos, participan en la maduración de células germinales, desarrollo embrionario y regulación metabólica. Además, tienen un rol clave en vías metabólicas, como la glucólisis, metabolismo de los lípidos y síntesis de catecolaminas (Reynhout y Janssens, 2019).

Se ha constatado que las toxinas lipofílicas son exudadas al medio tanto en entornos de laboratorio como en el medio natural (MacKenzie et al., 2004; Paz et al., 2004). A nivel global su monitoreo indica que el AO, DTX y PTX2 son las más comunes, poseen una alta tasa de detección en muestras de agua de mar en comparación con otras toxinas y están presentes en muestras estudiadas en todo el mundo (Wang et al., 2023; He et al. 2020), incluso se ha observado su presencia en partículas suspendidas y en carne de mariscos (Bosch-Orea et al., 2017; Chen et al., 2018). En el agua de mar se han registrado concentraciones variables de AO: en la Bahía de Haizhou (Mar Amarillo, China; 37°28'N 119°26'E) la concentración mínima detectada de esta toxina fue de 0,01 ng/mL, no obstante, en años anteriores, las concentraciones más altas de AO rodearon los 0,1 ng/mL (Chen et al. 2018). En la costa occidental del Mediterráneo la detección de AO ha alcanzado los 1,78 ng/mL (Bosch-Orea et al., 2017). En todos los casos existe una incidencia particularmente alta en el medio costero durante el verano (Chen et al., 2018; Hattenrath-Lehmann et al., 2018; Liu et al., 2017; Wang et al., 2023). El tiempo de permanencia del AO bajo luz solar natural varía, alcanzando los 20 días en otoño y tiempos mayores en invierno, temporada con menor radiación solar (Pan et al., 2020).

El uso de muestreadores pasivos (resinas sintéticas que adsorben las toxinas desde el agua de manera análoga a un bivalvo artificial; MacKenzie et al., 2004) ha posibilitado la detección de toxinas lipofílicas en costas chilenas como la región de Los Lagos (41°28'S 72°56'O), reportando altas concentraciones de PTX2 (hasta 71 ng/bag⁻¹) y la presencia de trazas de AO (Díaz et al. 2022; Pizarro et al. 2011). A pesar de estas bajas concentraciones, el AO no deja de ser una posible amenaza para el ecosistema ya que el dinoflagelado *Dinophysis acuminata*, productor de AO, es una de las especies de FANs más frecuentemente registradas en los monitoreos tanto en las aguas costeras como oceánicas a lo largo de toda la costa chilena (Paredes-Mella et al. 2022; Díaz et al. 2022).

La costa de la región del Bío Bío (36°46'S 73°03'O) es una zona de interés económico con capturas brutas relevantes a nivel nacional tanto para pesquerías bentónicas como pelágicas (Díaz, et al. 2020; Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura [SERNAPESCA], 2022). En esta zona se ha confirmado la presencia de microalgas productoras de toxinas aun cuando hasta la fecha no se han relacionado con eventos de FAN (Paredes-Mella et al., 2021). En el año 2022 en Golfo de Arauco (37°02'S 73°19'O), se informó sobre la primera detección de pectenotoxina-2 en mariscos, asociada a una intensa floración primaveral de *Dinophysis acuminata* (SEREMI de Salud, 2022). Estos hallazgos indican que tanto especies productoras de toxinas como algunas toxinas podrían estar presentes en esta latitud. Basándonos en estos antecedentes, es posible que, en el futuro cercano, se reporte con mayor frecuencia la presencia de toxinas lipofílicas, como el ácido okadaico en esta zona.

Aunque los efectos de estas toxinas en el ser humano están bien descritos, aún falta mucho por conocer sobre la interacción entre éstas con otros organismos de la columna de agua. Las biotoxinas ejercen efectos distintos en el sistema nervioso de vertebrados e invertebrados, como se evidencia en estudios donde toxinas producidas por dinoflagelados resultan letales para larvas, juveniles y adultos de diversas especies de peces bajo exposición directa de las toxinas o a través de la ingestión de dinoflagelados tóxicos (Seguel et al. 2010). En contraste, en invertebrados algunas toxinas tienen un impacto menos pronunciado en larvas y adultos de especies como langostas, jaibas, bivalvos, eufáusidos y copépodos, aunque algunos copépodos pueden experimentar efectos subletales, como cambios de comportamiento o disminución en la tasa de filtración (Turner, et al. 1998).

En Chile, se ha observado mortalidad de salmones relacionada con altas concentraciones de microalgas como *Alexandrium catenella*, caracterizada por branquias irritadas y abundante mucus en los peces muertos (Fuentes, et al. 2008). Sin embargo, la información sobre el impacto de estas microalgas y sus toxinas en organismos del meroplancton, como las larvas de peces, sigue siendo escasa.

1.2. Larvas de anchoveta (*Engraulis ringens*) como modelo de estudio.

La anchoveta (*Engraulis ringens*) es un pez de relevancia ecológica y comercial que se encuentra entre los primeros 30 a 50 km de la costa y en profundidades entre 3 a 80 m (Soto-Mendoza et al. 2010). Presenta un desove anual continuo y asociado a zonas costeras someras, observándose un período de desove principal entre los meses de invierno y primavera (julio-diciembre) (Cubillos & Arancibia 1993, Arcos et al. 1996). Específicamente, dentro del área de desove centro-sur de Chile, las mayores abundancias de huevos de esta especie han sido observadas en Punta Nugurne a Constitución (35°58'S 72°46'O a 35°19'S 72°25'O), desembocadura del Río Itata a Bahía Concepción (37°09'S 72°02'O a 36°42'S 73°1'O), Golfo de Arauco (37°02'S 73°19'O), y Lebu a Corral (37°34'S a 73°25'O a 39°52'S, 73°25'O) (Cubillos et al. 2005).

Para comprender plenamente los efectos que contaminantes o variaciones en el entorno pueden tener en los organismos marinos, es necesario investigar su impacto en todas las etapas de su ciclo de vida. Trabajar con larvas ofrece una alternativa para evaluar cómo estos agentes pueden influir en su desarrollo y supervivencia. Dado que las larvas son particularmente sensibles a los cambios ambientales y a la presencia de sustancias nocivas, estudiar su respuesta a estas condiciones adversas proporciona información valiosa para comprender los posibles efectos a largo plazo en la población adulta y, en última instancia, en el ecosistema en su conjunto. Una investigación centrada en larvas de anchoveta no solo contribuye a la gestión sostenible de esta especie clave, sino que también puede informar políticas de conservación más efectivas para mantener la salud de los ecosistemas marinos.

1.3. Impacto de las variaciones ambientales y biotoxinas sobre órganos mecanosensoriales: Evaluación a través del estudio de neuromastos de organismos marinos.

En los últimos años, en las costas del Bío Bío los valores de temperatura superficial durante los meses de julio a diciembre han fluctuado entre los 12 y 14°C (Castro et al. 2020, 2021) y los niveles de salinidad entre los 32 y 34 Unidades Prácticas de Salinidad (PSU). Se ha reportado que eventos como las olas de calor marinas, están aumentando en frecuencia, duración e intensidad en las últimas décadas (Oliver, 2019) particularmente en esta región (González-Reyes et al. 2023). Por otro lado, existe una tendencia que muestra un incremento de salinidad en la zona central de Chile, producto de la intensificación de la surgencia costera por el desplazamiento del centro de altas presiones del Pacífico sur y la disminución promedio de las precipitaciones (Schneider et al. 2017; Jacobo et al. 2018; Castro et al. 2020). No obstante, se ha reportado también el aumento de eventos de lluvia extrema en periodos transicionales (otoño, primavera) producto de ríos atmosféricos, que representan hasta el 45-60% de la precipitación total anual en la región (Bustos-Espinoza et al. 2024). Estas variaciones ambientales suponen un desafío para los organismos que habitan el océano tales como los estados tempranos de peces y las microalgas tóxicas. Se conoce que la temperatura y salinidad son factores que regulan la presencia y producción de toxinas en la medida que determinarían tanto el crecimiento y proliferación de las microalgas que las producen (Basti et al., 2018; Kamiyama et al., 2010). Algunos autores señalan que fluctuaciones en los parámetros abióticos del océano pueden desencadenar respuestas relacionadas a la producción de toxinas, tanto un aumento como una disminución, por parte de las microalgas (Wang et al. 2022; Bui et al. 2021; Kamiyama et al. 2010). Por otro lado, para el caso del AO se reconoce su estabilidad y alta persistencia en la columna de agua (Pan et al., 2020), representando un factor de estrés para los organismos marinos con los que coexiste, con impactos negativos en su crecimiento, metabolismo y rendimiento de la natación (Corriere et al., 2020).

Otros efectos podrían incluir las funciones del sistema sensorial que en larvas tempranas de peces corresponden a los neuromastos; grupos de células mecanosensoriales dispuestas en la superficie del cuerpo que al estar en contacto con el agua circundante captan los movimientos del agua traduciéndolos en impulsos nerviosos transmitidos a través de neuronas sensoriales creando una respuesta coordinada a los cambios en el entorno acuático (Figura 2) (Ghysen y Dambly-Chaudie, 2004). Al igual que la mayoría de los teleósteos, las larvas de anchoveta eclosionan con un conjunto de neuromastos en la cabeza y el cuerpo, con sus células ciliadas expuestas al agua ambiental (Llanos-Rivera et al., 2014). Este sistema

desempeña un papel esencial en diversas actividades vitales, como la detección de depredadores, presas u otros objetos del entorno por lo que son modelos ideales para evaluar los posibles efectos tóxicos de contaminantes ambientales dado que cualquier alteración en estas funciones adquiere una relevancia ecológica (Hung et al. 2023, Froehlicher et al., 2009).

La evaluación de la integridad de los neuromastos puede utilizarse para estudiar el efecto que el ácido okadaico puede tener sobre larvas de peces pelágicos pequeños, como la anchoveta, especialmente considerando un escenario futuro de variación ambiental. Existen algunos antecedentes de efectos negativos de las variaciones en parámetros fisicoquímicos de la columna de agua, como la temperatura y la salinidad, en el funcionamiento metabólico basal y en las tasas de eclosión de peces marinos (Castro et al., 2021; Portner & Farrel, 2008), pero no existe información de los efectos inducidos por AO junto con la variación ambiental. El estudio de potenciales efectos sinérgicos entre toxinas y el ambiente que rodea a estados de desarrollo de organismos marinos tales como peces, representa un nuevo enfoque de investigación relevante para entender las fuentes de variabilidad que afectan su sobrevivencia en ambientes sujetos a nuevos escenarios oceanográficos en la zona costera centro-sur de Chile.

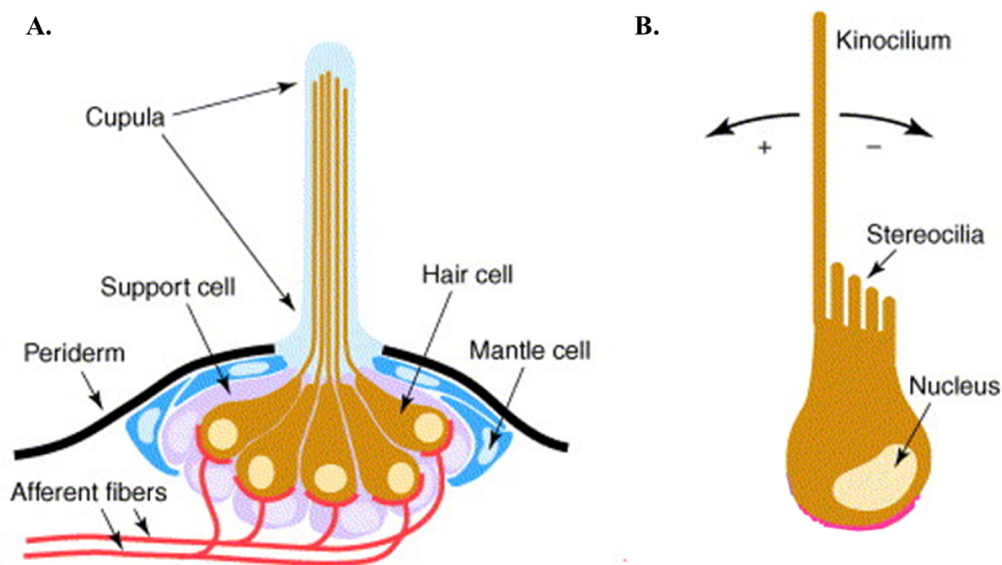


Figura 2: A. Esquema de un neuromasto, que ilustra los diferentes tipos de células implicadas y su organización. La cúpula es secretada por las células de sostén. No se han representado las células gliales que envuelven las fibras aferentes. B. Esquema de una célula ciliada, que ilustra su asimetría funcional. (Extraído y modificado de: Ghysen y Dambly-Chaudie, 2004).

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

La exposición a ácido okadaico (AO) combinado con variaciones de factores ambientales generará una alteración sobre la estructura de los neuromastos de larvas tempranas de anchoveta (*Engraulis ringens*).

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar variaciones estructurales en neuromastos de larvas tempranas de anchoveta (*Engraulis ringens*) producidas por la exposición a ácido okadaico en distintos rangos de temperatura y salinidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar los rangos de concentraciones de AO en los que es posible observar alteraciones estructurales en los neuromastos de larvas de anchoveta (*Engraulis ringens*).
2. Determinar si la exposición a valores proyectados de temperaturas y salinidad para la costa del Bío Bío induce daños estructurales en neuromastos de larvas de anchoveta (*Engraulis ringens*).
3. Evaluar posibles daños en la estructura de los neuromastos de larvas expuestas a AO con valores variables de temperatura y salinidad.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del área de estudio

Huevos de anchoveta (*Engraulis ringens*) fueron recolectados durante su estación reproductiva (fines de invierno y primavera) en el sector frente a la Bahía de Coliumo, región del Bío Bío, en 3 estaciones oceanográficas (Figura 3, Tabla 1) incluidas en la zona en la que se han reportado altas abundancias de huevos de esta especie (Soto-Mendoza et al., 2010). Además, con el fin de caracterizar el entorno oceanográfico en el que se desarrollan estos estadios se realizaron lances de CTD (SBE-19plus) en los puntos de muestreo hasta profundidades aproximadas de 50 metros (dependiendo de la profundidad del fondo de cada estación) para obtener perfiles de salinidad y temperatura.

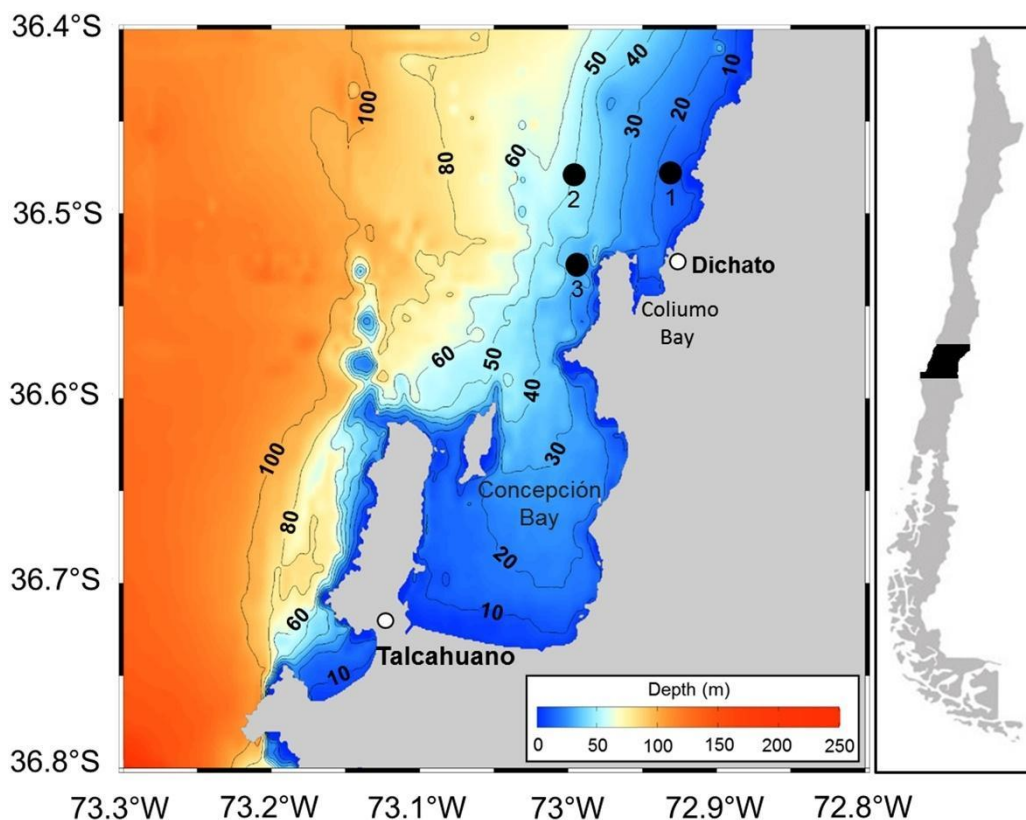


Figura 3: Área de estudio. Bahía Coliumo, se destacan con círculos negros los puntos en los que se realizaron los muestreos.

3.2. Obtención del material biológico:

En total se realizaron seis muestreos planctónicos, entre septiembre y diciembre del año 2023 (Tabla 1). Para asegurar el número de huevos necesarios para cada experimento, en cada estación se realizaron entre dos y tres lances con arrastres oblicuos de entre 3 y 5 minutos con una red bongo (malla de 300 μm , diámetro de boca de 60 cm), manteniendo la embarcación en movimiento a una velocidad de 2 a 3 nudos. Las profundidades de estos lances variaron en cada estación, pero se mantuvieron en el rango de 20 a 40 metros de profundidad, rango de profundidad donde se suelen encontrar huevos de anchoveta en esta zona (Castro et al. 2021). En cada estación se tomaron muestras de agua de mar para incubaciones en el laboratorio con botellas Niskin de 5 L.

Una vez obtenida cada una de las muestras, éstas fueron diluidas y almacenadas individualmente en bolsas plásticas herméticas (27x28 cm) conteniendo agua de mar de la misma zona de muestreo. Cada muestra fue almacenada en un contenedor, también hermético, para luego ser trasladada al laboratorio ubicado en las dependencias de la Universidad de Concepción en la ciudad de Concepción. Durante el transporte se cuidó de no exponer los contenedores a luz directa, cambios de temperatura o movimientos bruscos velando así por la integridad de la muestra de plancton.

En el laboratorio, utilizando una lupa estereoscópica con fuente de luz fría, se llevó a cabo la separación de los huevos en estados tempranos de desarrollo embrional, desde el plancton. Estos huevos (Figura 4 a, b) fueron luego incubados en agua de mar filtrada (0,2 micras) en frascos con un volumen de 500 mL manteniendo una densidad de 50 a 60 huevos por cada 100 mL. Las muestras se mantuvieron en una incubadora a una temperatura constante de 12°C, siendo diariamente removidos los huevos muertos u otras impurezas hasta la eclosión (Figura 4 c).

Con el material biológico obtenido se realizaron dos sets de experimentos (Tabla 1); los primeros para estandarizar algunos aspectos del diseño experimental (definición de control positivo y concentración adecuada de AO), y los segundos corresponden a tres experimentos con diseño experimental completo, es decir, réplicas del mismo experimento con batches distintos de huevos.

Tabla 1: Detalle de embarques: Muestreos y destino del material biológico

Fecha de muestreo		Objetivo
Primer set	02.09.2023	Estandarización de conteo de neuromastos
	25.09.2023	Estandarización del control positivo (CuSO ₄)
	02.10.2023	Evaluación de daño con diferentes concentraciones de AO
Segundo set	17.10.2023	Experimento 1
	15.11.2023	Experimento 2
	15.12.2023	Experimento 3

3.3. Primer set de experimentos: Estandarización de métodos.

3.3.1 Estandarización del conteo de células de neuromastos como método de evaluación de daño.

Con el objetivo de evaluar la interacción directa entre los organismos y el agua circundante, los experimentos se realizaron a través de la inmersión de las larvas en agua de mar filtrada y preparada acorde a cada uno de los tratamientos a evaluar. El estadio seleccionado para la realización de los experimentos correspondió a larvas con saco vitelino eclosionadas desde los huevos colectados en terreno, con cerca del 50% de las reservas de vitelino ya consumidas (Figura 4 d). De este modo, al no tener su sistema digestivo aún desarrollado las larvas se expusieron por inmersión a la toxina evitándose algún tipo de interferencia por posible ingestión de ésta. Para esto las larvas fueron seleccionadas cuidadosamente bajo lupa, asegurándose que cumplieran con la condición antes descrita.

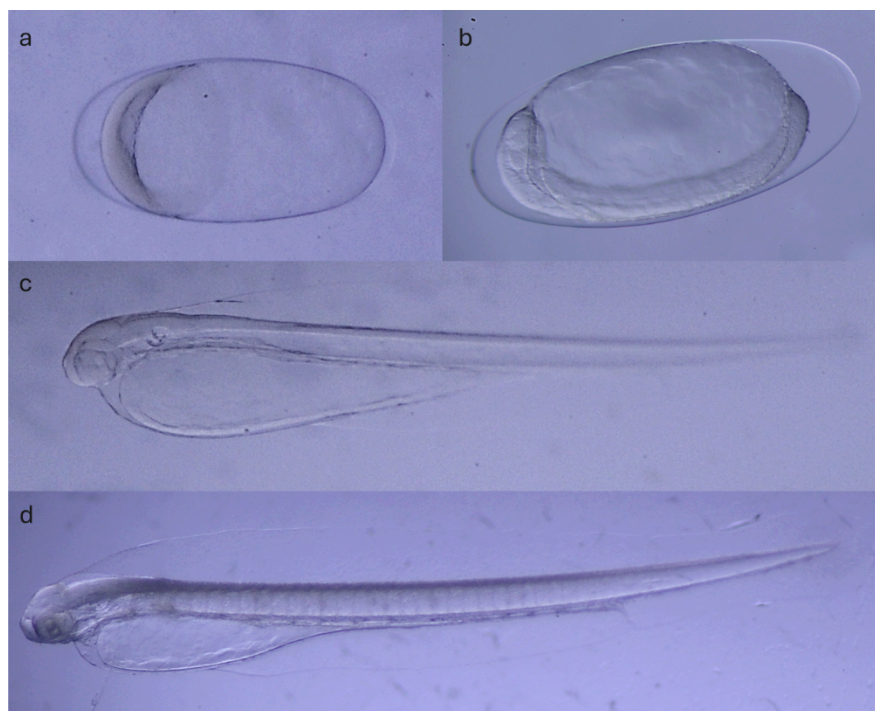


Figura 4: Estadíos de *Engraulis ringens* observados durante la incubación. Tras la incubación de los huevos (a, b) las larvas (c, d) eran observadas durante su crecimiento hasta el estadio definido para el montaje de los experimentos (d) (absorción parcial del saco vitelino).

Se consideró como control positivo el sulfato de cobre (CuSO_4) a una concentración de $50 \mu\text{M}$, concentración que ha mostrado inducir daño en los neuromastos de otros teleósteos (Hernandez, et al. 2006). Se realizaron tres réplicas, cada uno con 15 larvas, las que fueron incubadas en esta solución durante 20 minutos a una temperatura de 12°C en placas de 12 multipocillos, con una densidad de 5 a 7 larvas por pocillo. Al mismo tiempo, el mismo número de larvas eran incubadas en agua de mar como control negativo, bajo las mismas condiciones experimentales.

Para evaluar la integridad estructural de los neuromastos, se utilizó la tinción de DiAsp (4-(4 dietil aminosteril)-N-metilpiridina oxidado; Sigma-Aldrich). El DiAsp es incorporado por las células ciliadas que poseen canales mecanotransductores intactos, lo que permite visualizar aquellas células que presentan sus canales activos (Mardones, 2010; Nishikawa y Sasaki, 1996). Luego de la exposición a las condiciones experimentales las larvas fueron expuestas por 10 minutos a DiAsp (5 ng/mL en agua de mar) y luego lavadas en agua de mar durante otros 10 minutos. Tras la tinción las larvas fueron anestesiadas con tricaina $0,4\%$

(Sigma Aldrich) y bajo lupa fueron montadas individualmente en un portaobjeto con un cubreobjeto provisto de un tope de plasticina.

Se empleó un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse E200) y bajo luz UV las larvas fueron observadas individualmente. Para cada una de las larvas se llevó a cabo el conteo de células vivas, identificadas como aquellas que mostraban una tinción positiva al DiAsp; en tres neuromastos laterales específicos (3, 4, 5) ubicados en la zona media del cuerpo de la larva (Figura 5 A). Estos neuromastos fueron elegidos siguiendo a otros autores que evaluaron neuromastos funcionales en otras especies de peces (Lin, et al. 2023; Hernandez, et al. 2006) y por la facilidad técnica que significaba contar las células viables en aquellos neuromastos alejados del saco vitelino que por su autofluorescencia interfiere en la señal fluorescente de estas estructuras. Se estableció como criterio para clasificar una célula como viable aquellas que presentaban una tinción uniforme y una morfología similar a la de un pétalo de flor (Figura 5 B).

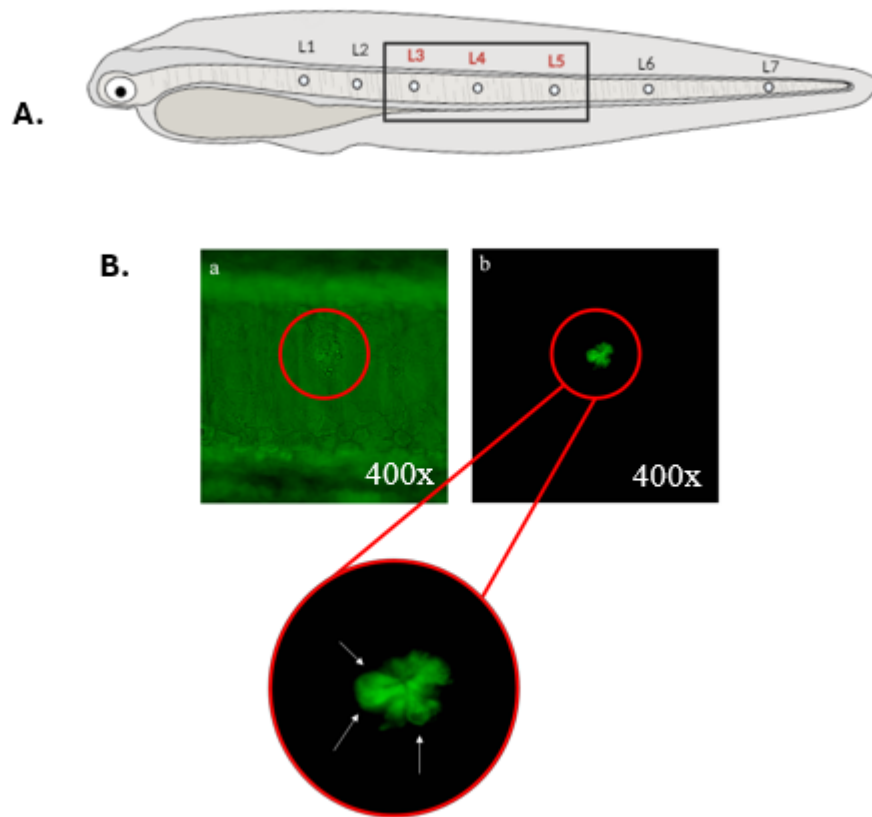


Figura 5: A. Esquema de disposición de neuromastos (L1 a L7) en el cuerpo de una larva de anchoveta. Resaltados en rojo los neuromastos en los que se realizó conteo de células vivas. No se han representado los neuromastos de la cabeza. **B. Visualización in vivo d de sección media del cuerpo de larva de anchoveta expuesta a agua de mar (control negativo) y teñida con DiAsp bajo microscopio (400x).** Se distingue un único neuromasto (L3), visible incluso sin fluorescencia (a), bajo el filtro de fluorescencia (b) y el detalle de sus células. Las flechas blancas indican aquellas células consideradas viables para el conteo.

3.3.2 Evaluación de rangos de concentraciones de ácido okadaico (AO) que inducen alteraciones sobre los neuromastos.

Para evaluar el efecto del AO en las células que componen cada neuromasto se evaluaron tres concentraciones definidas sobre la base de antecedentes bibliográficos para otras zonas geográficas. Chen et al. (2018) mencionan que la concentración máxima de AO disuelto en agua detectada en costas chinas ha rodeado los 0,1 ng/mL. Por otro lado, Bosch-Orea et al. (2017) indican que para otras zonas como la costa española las detecciones de AO han superado el valor de 1 ng/mL. Es importante considerar que durante eventos FAN existe una mayor densidad celular y por ende una mayor concentración de toxinas como el AO; adicionalmente, varios autores han sugerido que los eventos FAN en el futuro aumentarán tanto en el número de eventos como en su intensidad (densidad celular) por lo que se propuso incluir una concentración por sobre los valores descritos por Bosch-Orea et al. (2017).

La solución estándar pura de ácido okadaico (AO) fue adquirida en el National Research Council Canada (CRM-OA-d). Para preparar las soluciones, se tomaron alícuotas de ácido okadaico y se evaporaron, a través de un concentrador de muestras acoplado a una bombona de nitrógeno, para eliminar el metanol en el que viene disuelta la toxina. Posteriormente, se resuspendió el AO en agua de mar, se almacenó en viales de vidrio ámbar y se dejó homogeneizando con agitación suave durante toda una noche.

Para este experimento larvas de anchoveta (n= 15) fueron expuestas a concentraciones crecientes de AO de 0,1 , 1 ,y 10 ng/mL e incubadas durante 20 minutos a 12°C con el fin de evaluar el daño agudo inducido por la toxina. Se incluyeron además larvas expuestas en control positivo (CuSO_4 ; n=15) y negativo (agua de mar; n=15). Para evitar algún tipo de sesgo por parte del operador, durante el conteo las observaciones se realizaron de manera aleatoria mediante un análisis ciego.

3.4 Segundo set de experimentos: Evaluación de variaciones de temperatura, salinidad y ácido okadaico sobre los neuromastos de larvas de anchoveta.

Para definir si las variaciones en las condiciones ambientales de temperatura y salinidad alteran por sí solas (sin AO) la integridad de las células que componen los neuromastos, se definieron los valores normales de temperatura y salinidad a partir de los

perfiles hidrográficos obtenidos con CTD en los primeros tres muestreos (ver Tabla 1). Registros previos durante la temporada de desove de anchoveta en el área de estudio mostraron valores de temperatura promedio cercanos a los 12°C y valores de salinidad entre 33 y 34 PSU para los primeros 30 - 40 metros de profundidad (Castro et al., 2019). Utilizando los datos obtenidos del CTD, se generaron perfiles para calcular los valores promedio de cada parámetro. Estos valores se utilizaron como referencia para definir las condiciones experimentales, que deben reflejar las condiciones ambientales naturales en las que se encuentran los huevos y larvas de anchoveta. El análisis de los perfiles reveló que la temperatura en los primeros 30 metros de profundidad osciló alrededor de los 12°C y la salinidad alrededor de los 34 PSU en el área de estudio. Para evaluar escenarios más allá de la condición normal actual, se consideró utilizar variaciones de estos valores de temperatura y salinidad por lo que se definió 14°C para el tratamiento de temperatura y 32 PSU para el tratamiento de salinidad. La variación de temperatura realizada se pensó sobre la base del aumento observado de los eventos de olas de calor en la zona y para la variación de salinidad el aumento observado de eventos de lluvia extrema producto de ríos atmosféricos en periodos transicionales (primavera y otoño) (Oliver, 2019; Bustos-Espinoza et al. 2024). Finalmente, también se consideró un tratamiento combinado con ambos valores, 14°C y 32 PSU.

En consecuencia, en cada uno de los tres experimentos (correspondientes a los lotes de huevos de octubre, noviembre y diciembre), los huevos recolectados y separados del plancton se incubaron por separado bajo cada una de estas combinaciones de condiciones ambientales. Al alcanzar el 50% de absorción vitelina, se seleccionaron 15 larvas del saco vitelino para someterse al procedimiento de tinción DiAsp descrito en la sección 3.3.1. Por otro lado, para evaluar la influencia de la OA sobre la integridad de las células ciliadas de los neuromastos, se realizaron incubaciones en 1 ng/mL de OA durante 20 minutos en 15 larvas de cada tratamiento mencionado antes de la tinción con DiAsp. Después de la tinción, todas las larvas se sometieron al mismo procedimiento de conteo bajo el microscópico descrito en la sección 3.3.1, estos se realizaron de manera aleatoria mediante un análisis ciego.

3.5 Análisis estadísticos

En cada uno de los tres primeros experimentos se calculó el número promedio de células viables en los neuromastos observados por individuo (n=3). La normalidad dentro del

grupo de cada conjunto de datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, mientras que la homogeneidad de la varianza se verificó mediante la prueba de Bartlett. Dependiendo de los resultados, se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas o no paramétricas para evaluar el efecto del CuSO_4 y de las diferentes concentraciones de AO en los neuromastos. El efecto del CuSO_4 se evaluó mediante la prueba de Mann-Whitney, mientras que el efecto de diferentes concentraciones de AO se comparó mediante ANOVA y las pruebas post-hoc de Tukey utilizando el software GraphPad Prism (versión 9.2.0).

Para los últimos tres experimentos, los datos sobre células viables se clasificaron según los tratamientos y se calculó el número promedio de células viables para cada individuo. La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, que indicó que los datos no seguían una distribución normal. Los valores atípicos se eliminaron de cada conjunto utilizando el método de puntuación z para cada tratamiento ($\text{puntuación } z = (\text{valor} - \text{media})/\text{DE}$), considerando los valores con puntuaciones $z > 1$ como valores atípicos. Después de la eliminación de los valores atípicos, las comparaciones se realizaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis seguida de las pruebas post-hoc de Dunn utilizando el paquete básico del software R (<https://cran.r-project.org/>).

4.- RESULTADOS

4.1. Descripción del área de estudio

Los valores de temperatura oscilaron entre 11,3°C en la superficie y 12,6°C a 40 m de profundidad en las fechas de muestreo de septiembre a octubre. La temperatura en los dos primeros muestreos mostró una disminución gradual con la profundidad (Figura 6), pero en octubre la termoclina fue más pronunciada y se ubicó dentro de los primeros 10 metros de profundidad. La salinidad varió entre 32 y 34,4 en todos los perfiles; los valores más bajos ocurrieron en aguas poco profundas a principios de la temporada (septiembre). Sin embargo, a finales de septiembre y en octubre, la mayor parte de la columna de agua a más de 5 o 10 m de profundidad permaneció con salinidades de alrededor de 34 o más a medida que aumentaba la profundidad. En octubre, los perfiles de salinidad no exhibieron una haloclina pronunciada, lo que, junto con la menor temperatura, sugería que estaba ocurriendo un evento de surgencia durante la fecha del muestreo, por lo que los rangos de valores más frecuentes en las capas someras oscilaron entre 12° y 34 PSU.

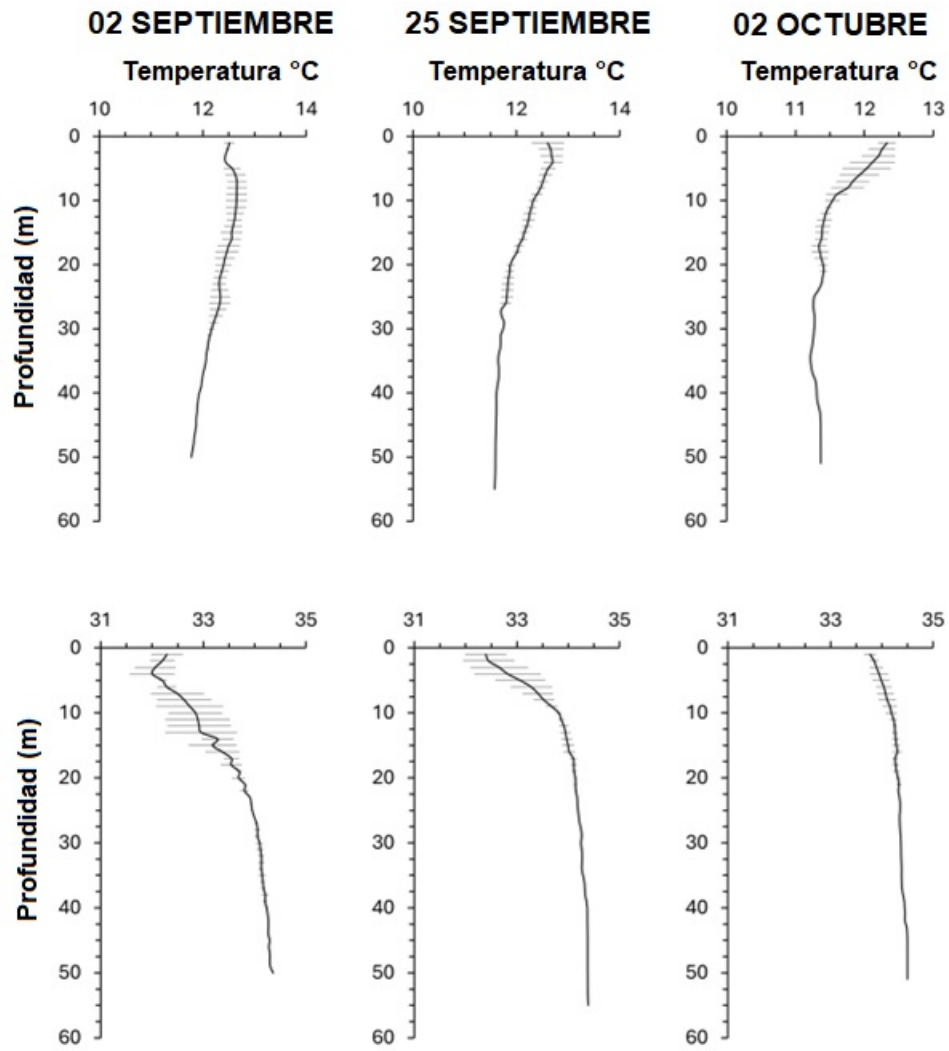


Figura 6: Perfiles de temperatura y salinidad para el área de estudio durante muestreos realizados en septiembre y octubre. Se presentan los valores promedio, las líneas horizontales corresponden a la desviación estándar.

4.2 Estandarización de conteo de células de neuromastos: evaluación de CuSO_4 como control positivo de daño en células de neuromastos.

En las larvas expuestas a CuSO_4 (50 μM), el número de células viables en los neuromastos analizados fue menor ($1,04 \pm 0,99$) que el número de células viables en las larvas expuestas solo al agua de mar ($6,0 \pm 2,2$) (control negativo). Esta disminución de casi el 85% en el número de células viables por neuromasto fue estadísticamente significativa (prueba de Mann-Whitney; $p < 0,0001$, Figura 7), lo que confirma que i) los neuromastos de las larvas tempranas de anchoveta pueden verse afectados por compuestos tóxicos, ii) que la metodología de recuento de células con la tinción DiAsp es efectiva para evaluar este daño y iii) que es inocua para las larvas, ya que no generó mortalidad ni ningún otro tipo de daño. El tratamiento con cobre se incluyó en cada uno de los experimentos realizados posteriormente, observándose este resultado en todos ellos.

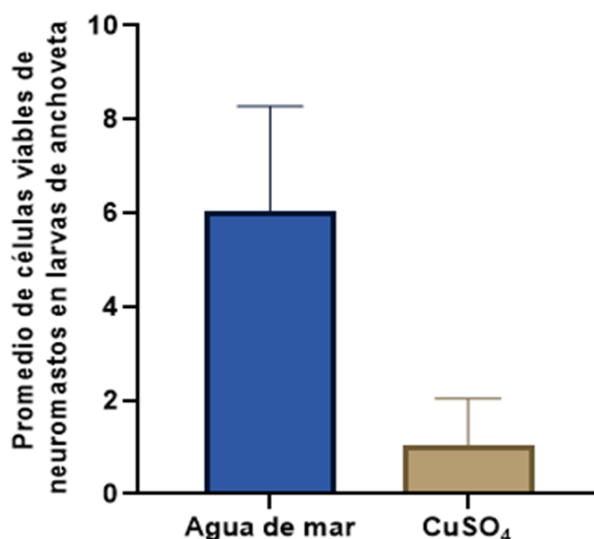


Figura 7: Número promedio de células viables de neuromastos laterales 3, 4, 5 de larvas de anchoveta en tratamientos control positivo (CuSO_4) y negativo (agua de mar). El número de larvas analizadas por tratamiento fue de 43 y provino de 3 muestreos.

4.3 Evaluación de rangos de concentraciones de ácido okadaico (AO) que inducen alteraciones sobre los neuromastos.

Los resultados de este experimento revelaron una relación inversa entre la concentración de toxina a la que fueron expuestas las larvas y el número de células viables contadas en los neuromastos analizados (Figura 8, Tabla 2). A medida que aumentó la concentración de AO, se observó una disminución en el número de células viables; sin embargo, estas diferencias sólo fueron significativas al comparar entre larvas expuestas al control negativo con aquellas expuestas a concentraciones más altas de AO (T. Tukey; 1 ng/mL, $p=0,0363$; 10 ng/mL, $p<0,0001$). Al comparar con el control positivo (CuSO_4) se observó que el daño inducido por la toxina en las larvas de anchoveta es menor que el que induce el sulfato de cobre, teniendo diferencias significativas con las dos concentraciones menores (T. Tukey; 0,1 ng/mL, $p<0,0001$; 1 ng/mL, $p=0,0001$). Sobre la base de estos resultados se definió que para los siguientes experimentos se utilizaría la concentración AO de 1 ng/mL.

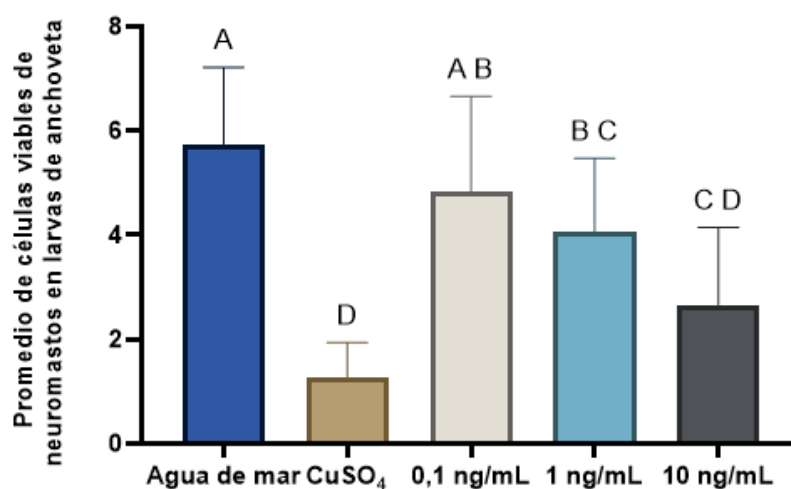


Figura 8: Evaluación del efecto de concentraciones crecientes de AO en células de neuromastos. Número promedio de células viables de neuromastos de larvas de anchoveta expuestas a AO en tres concentraciones. Las comparaciones estadísticas entre tratamientos (Agua de mar, CuSO_4 , 0,1, 1 y 10 ng/mL AO) se representan con letras mayúsculas, tratamientos con letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre ellos.

Por ejemplo: 0,1 ng/mL no difiere significativamente con el tratamiento de agua de mar (A), ni con el tratamiento de 1 ng/mL (B).

Tabla 2: Matriz de comparaciones múltiples (T. Tukey). Valores de p de las comparaciones entre tratamientos (Agua de mar, CuSO₄, 0,1, 1 y 10 ng/mL AO). Se destacan subrayadas las comparaciones con diferencias significativas (p<0,05).

p	Agua de mar	CuSO ₄	AO 0,1 ng/mL	AO 1 ng/mL	AO 10 ng/mL
Agua de mar	-	<u>≤0,0001</u>	0,4961	<u>0,0363</u>	<u>≤0,0001</u>
CuSO ₄		-	<u>≤0,0001</u>	<u>0,0001</u>	0,1344
AO 0,1 ng/mL			-	0,6110	<u>0,0014</u>
AO 1 ng/mL				-	0,0914
AO 10 ng/mL					-

4.4 Evaluación de daño generado por variaciones de temperatura y salinidad sobre neuromastos de larvas de anchoveta.

Para evaluar si las condiciones ambientales proyectadas para la zona de estudio por sí solas inducen un daño en los neuromastos, se expusieron a las larvas de anchoveta a distintas combinaciones de temperatura y salinidad en tres fechas de octubre a diciembre (Experimentos 1-3). Se hicieron tres experimentos con distintas combinaciones, en el primer experimento (correspondiente al mes de octubre; Tabla 1) no se incluyó un tratamiento de variables combinadas (14°C, 32 PSU).

Los resultados indican que, en la condición ambiental definida como normal (12°C, 34 PSU), el número de células viables en los neuromastos varió entre experimentos (Figura 9); disminuyendo progresivamente conforme avanzaba la temporada de desove. Los valores más altos de promedio de células viables fueron de 7,4 (DE=3,77) para el mes de octubre (Exp. 1), y los más bajos se obtuvieron en el mes de diciembre (Exp. 3) con 4,4 células (DE=2,27) que coincide con el periodo final de la época de desove de la anchoveta en la zona.

La comparación entre tratamientos de condiciones ambientales indicó una disminución en el número de células viables en larvas expuestas al tratamiento de variación de salinidad ($T_{12} S_{32}$) en comparación con lo cuantificado en la condición ambiental normal ($T_{12} S_{34}$) con diferencias estadísticamente significativas en el primer (octubre) y tercer (diciembre) experimento (Tabla 3, Exp 1: Test Dunn, $p= 0,0046$, Exp 3: Test Dunn, $p= 0,0078$). Lo anterior podría indicar el efecto negativo en los neuromastos producto de una menor salinidad en el medio; sin embargo, esa diferencia no se observa en aquellos tratamientos en los cuales junto con la disminución de salinidad hubo una temperatura ambiente mayor (variables combinadas, $T_{14} S_{32}$). En esta condición el número de células viables en los neuromastos fue igual a lo cuantificado en larvas expuestas a la condición normal (Exp 2: Test Dunn, $p= 0,5739$, Exp 3: Test Dunn, $p= 0,6228$). En larvas que fueron expuestas al tratamiento de variación de temperatura ($T_{14} S_{34}$) los resultados fueron similares a lo cuantificado en condición normal (Exp 2: Test Dunn, $p= 0,0943$, Exp 3: Test Dunn, $p=0,3526$).

Tanto para los tratamientos de variación de salinidad ($T_{12} S_{32}$) y de temperatura ($T_{14} S_{34}$) en los experimentos 1 y 2 mostraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 3, Exp. 1: Test Dunn. $p=0,0161$, Exp 2: Test Dunn $p=0,0019$), mostrando un menor número promedio de células ciliadas viables en el tratamiento de 32 psu de salinidad.

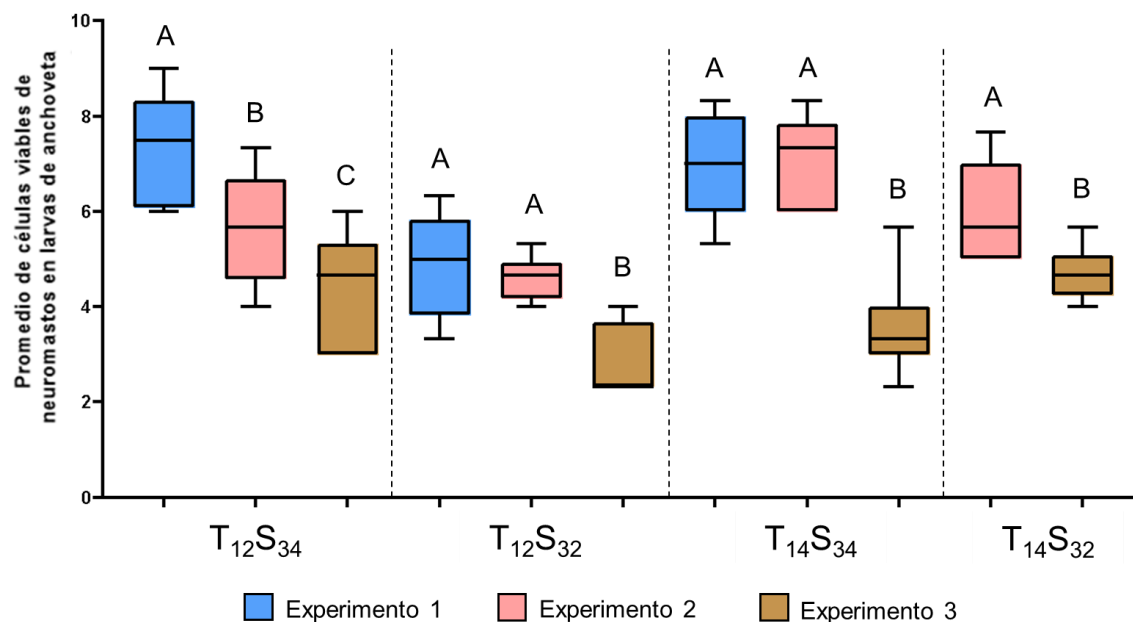


Figura 9: Efecto de diferentes combinaciones de temperatura y salinidad (tratamientos) en el número de células viables de neuromastos de larvas de anchoveta en los tres experimentos realizados. Los extremos de las cajas muestran los cuartiles superiores (Q3) e inferiores (Q1), la línea horizontal representa la mediana de los datos y las líneas verticales el valor máximo y mínimo para cada tratamiento. Las comparaciones estadísticas de un mismo tratamiento entre experimentos se representan con letras mayúsculas, tratamientos con letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre ellos. Por ejemplo: en el tratamiento $T_{12}S_{32}$, no hubo diferencias significativas entre los experimentos 1 y 2 (A), pero si ambos con el experimento 3 (B).

4.5 Evaluación del efecto de AO con variaciones de temperatura y salinidad ambiental en los neuromastos de larvas de anchoveta.

En los tres experimentos, donde las larvas fueron expuestas a AO junto con diferentes combinaciones de temperatura y salinidad, se observa una tendencia consistente: el AO parece inducir una disminución en el número de células viables en todos los casos, excepto cuando se aplicó la variación de salinidad ($T_{12}S_{32}$), como se muestra en la Figura 10.

Los resultados indican que la temperatura parece desempeñar un papel importante en la reducción del número de células ciliadas viables de neuromastos en presencia de AO en al menos dos de los tres experimentos realizados, mostrando diferencias significativas en ambos casos (Tabla 3; Exp 1: Test Dunn, $p=0,0560$; Exp 3: Test Dunn, $p=0,0170$). Es importante destacar que este tratamiento exhibió los valores promedio más bajos de células ciliadas en neuromastos (Exp 1: 1,48; Exp 2: 3,5; Exp 3: 1,64 células).

Sin embargo, en el segundo experimento, no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento de condiciones normales y el tratamiento de temperatura. Tampoco se observaron diferencias significativas entre el tratamiento normal y el tratamiento de salinidad (Exp 2: $T_{14}S_{34}$, test Dunn, $p=0,7093$; $T_{12}S_{32}$, test Dunn, $p=0,4586$).

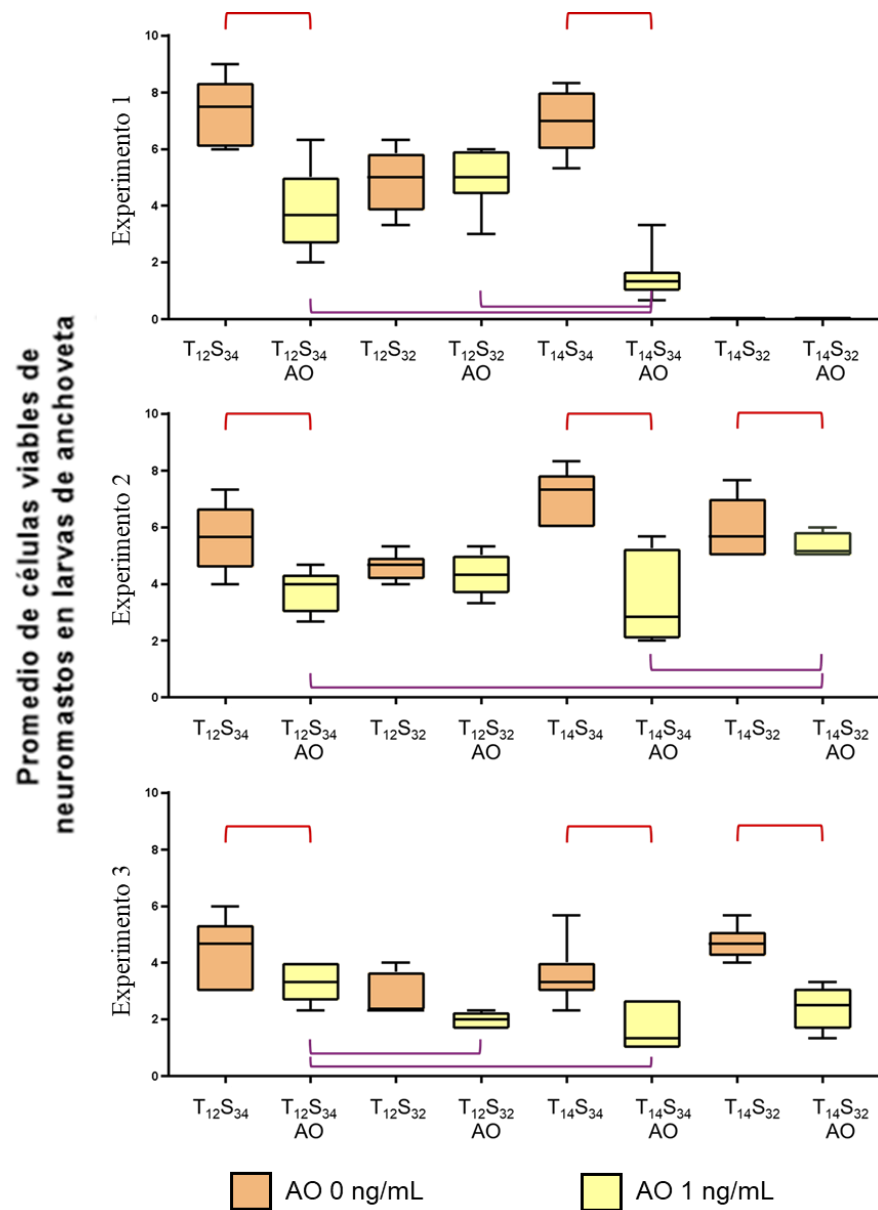


Figura 10: Efecto del AO y diferentes combinaciones de temperatura y salinidad en el número de células viables de neuromastos. Los extremos del cuadro muestran los cuartiles superior (Q3) e inferior (Q1), la línea horizontal representa la mediana de los datos y las líneas verticales el valor más alto y más bajo para cada tratamiento. Los corchetes indican las comparaciones estadísticas en las que se encontró diferencia significativa: los rojos entre un mismo tratamiento con y sin ácido okadaico. Los corchetes morados indican diferencias significativas entre tratamientos distintos sólo con AO.

Tabla 3: Matriz de comparaciones múltiples (T. Dunn) por experimento. Comparaciones estadísticas entre distintos tratamientos ($T_{12} S_{34}$, $T_{12} S_{32}$, $T_{14} S_{34}$ y $T_{14} S_{32}$ con y sin AO). Se entregan los valores de p, se destacan subrayadas las comparaciones con diferencias significativas ($p < 0,05$).

Experimento 1	$T_{12} S_{34}$	AO $T_{12} S_{34}$	$T_{12} S_{32}$	AO $T_{12} S_{32}$	$T_{14} S_{34}$	AO $T_{14} S_{34}$
$T_{12} S_{34}$	-	<u>0,0008</u>	<u>0,0046</u>	<u>0,0078</u>	0,7115	<u>0,0000</u>
AO $T_{12} S_{34}$		-	0,4539	0,3876	<u>0,0027</u>	0,0560
$T_{12} S_{32}$			-	0,8658	<u>0,0161</u>	<u>0,0057</u>
AO $T_{12} S_{32}$				-	<u>0,0270</u>	<u>0,0052</u>
$T_{14} S_{34}$					-	<u>0,0000</u>
AO $T_{14} S_{34}$						

Experimento 3	$T_{12} S_{34}$	AO $T_{12} S_{34}$	$T_{12} S_{32}$	AO $T_{12} S_{32}$	$T_{14} S_{34}$	AO $T_{14} S_{34}$	$T_{14} S_{32}$	AO $T_{14} S_{32}$
$T_{12} S_{34}$	-	<u>0,0040</u>	<u>0,0167</u>	<u>0,0005</u>	0,0926	<u>0,0003</u>	0,6230	<u>0,0068</u>
AO $T_{12} S_{34}$		-	0,4338	<u>0,0386</u>	<u>0,8070</u>	<u>0,0090</u>	<u>0,0068</u>	<u>0,0859</u>
$T_{12} S_{32}$			-	0,0810	<u>0,0010</u>	<u>0,0310</u>	<u>0,0039</u>	0,2092
AO $T_{12} S_{32}$				-	<u>0,0006</u>	0,8290	<u>0,0009</u>	0,0866
$T_{14} S_{34}$					-	<u>0,0007</u>	0,2870	<u>0,0460</u>
AO $T_{14} S_{34}$						-	<u>0,0009</u>	<u>0,0412</u>
$T_{14} S_{32}$							-	<u>0,0608</u>
AO $T_{14} S_{32}$								-

5.- DISCUSIÓN

Dada la naturaleza heterogénea y los diferentes mecanismos de acción de factores que son estresantes o directamente dañinos para los organismos acuáticos, la coexistencia de varios de ellos puede resultar en efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos sobre los organismos que los enfrentan (Velasco et al. 2018). Con el propósito de investigar posibles variaciones estructurales en los neuromastos de la línea lateral de las larvas tempranas de anchoveta en respuesta a la exposición al ácido okadaico (AO), así como a diferentes niveles de temperatura y salinidad, se realizaron experimentos con diferentes combinaciones de estas tres variables. Los resultados muestran una influencia de los cambios estacionales ambientales en la calidad de las larvas y de sus neuromastos, así como una influencia significativa de la variación de la salinidad en el número de células vivas de estos órganos. Además, al evaluar los efectos combinados de la presencia de la toxina y variaciones ambientales, se observa una influencia de la temperatura en los efectos dañinos del AO sobre las células ciliadas.

Estudios realizados en larvas de varias especies acuáticas, tanto de agua dulce como marinos, que analizaron los impactos que generan las variaciones de las condiciones ambientales, como la temperatura y la salinidad, revelan que tales variaciones tienen un impacto significativo en la supervivencia, crecimiento y procesos biológicos fundamentales como la velocidad de natación (Politis et al. 2018; Collazos-Lasso, et al. 2014; Montory et al. 2014). Específicamente para la anchoveta (*Engraulis ringens*) se ha reportado que la temperatura modula la duración de la fase larval de saco vitelino, la tasa de consumo de vitelo y la tasa de crecimiento larvario (Llanos-Rivera & Castro, 2006). Por otra parte, variaciones de salinidad han sido relacionadas con cambios en la expresión genética de la enzima de eclosión y el éxito de la eclosión larval (Castro et al. 2021). No obstante, estos estudios aportan antecedentes de los efectos de las variaciones ambientales en procesos embrionarios y larvales relevantes, a la fecha no se ha reportado evidencia del efecto que variaciones en temperatura y salinidad podrían tener en el sistema mecano receptor de la línea lateral en esta especie.

Uno de los primeros resultados del presente estudio sugiere que, bajo la misma condición experimental (definida como normal: 12°C y 34 PSU), el número de células viables en los

neuromastos varió, disminuyendo progresivamente durante la temporada de desove de la especie. Para esta zona se reconoce un período principal de desove entre invierno y primavera, con un máximo reproductivo en agosto (Cubillos et al. 2001) y nuestros experimentos se montaron con huevos recolectados en meses posteriores a este pico (octubre, noviembre y diciembre). Las larvas provenientes de huevos recolectados en el mes más cercano al pico del período de desove tuvieron un mayor número promedio de células ciliadas viables, en comparación con lo cuantificado en larvas obtenidas de huevos desovados hacia el final de periodo reproductivo. Adicionalmente, se constató para este periodo una mayor labilidad larval que hizo que su manipulación fuera considerablemente más compleja. Lo anterior es consistente con las variaciones estacionales en la calidad de los huevos y larvas de pequeños peces pelágicos reportadas utilizando varios indicadores. Por ejemplo, para esta especie tanto la composición bioquímica (proteínas, lípidos o aminoácidos libres) como el tamaño del huevo, indican una disminución en la calidad de los propágulos en la medida que la época de desove avanza (Llanos-Rivera & Castro, 2004; Castro et al. 2009). Para *Strangomera bentincki*, otro Clupeiformes presente en la misma zona geográfica, se ha observado una tendencia al aumento en el nivel de anomalías embrionarias a medida que la estación reproductiva avanza (Vásquez et al. 2010).

Los cambios ambientales estacionales, como la salinidad y la temperatura, también pueden influir directamente en la integridad de los neuromastos de las larvas de anchoveta. La salinidad, como uno de los parámetros fisicoquímicos más importantes en los ecosistemas marinos, varía considerablemente en diferentes hábitats y períodos estacionales, afectando la supervivencia, el metabolismo y la distribución; además de los tiempos de eclosión y tasas de consumo de oxígeno de los estados tempranos de varias taxa (Castro et al. 2021; Montory et al. 2014; Varsamos et al. 2005). En este estudio, mediante tratamientos a distintas salinidades, se aporta evidencia que sugiere que una disminución de la salinidad podría afectar la estructura e integridad de las células ciliadas presentes en los neuromastos laterales de larvas de anchoveta. Los neuromastos mantienen, a las células ciliadas inmersas en microambientes fluidos mantenidos electrogénicamente, cubiertas por una cúpula gelatinosa que proporciona un microambiente eléctrico e iónico que se mantiene activo y que es necesario para que las células ciliadas se despolaricen cuando se activan mecánicamente, iniciando la transducción sensorial (Peloggia et al. 2020). En larvas de pez cebra (*Danio rerio*), otro teleósteo, se ha

identificado como cambios ambientales de salinidad, en ambientes isotónicos, inducen una cascada de señalización que hace que células epiteliales se diferencien en ionocitos, que mantienen el equilibrio iónico asegurando las condiciones para la funcionalidad de las células ciliadas (Stawicki et al. 2014; Peloggia et al. 2024; Peloggia et al. 2022). La ablación genética de estos ionocitos así como la exposición a agua acidificada, causan un deterioro de la función de las células ciliadas, lo que sugiere que las células ciliadas precisan de un entorno iónico amortiguado para funcionar correctamente (Lin et al., 2019; Stawicki et al., 2014).

En las últimas décadas, se han investigado los posibles efectos tóxicos del AO, más allá de su papel como toxina DSP. Se han informado alteraciones en el ADN y de los componentes celulares, así como de efectos sobre el sistema inmunológico y nervioso, e incluso sobre el desarrollo embrionario (Valdiglesias et al., 2013). En peces, la exposición aguda a esta toxina genera alteraciones en los parámetros oxidativos que inducen malformaciones en las larvas de medaka (*Oryzias latipes*) (Figuerola et al. 2022), alteraciones en el desarrollo embrionario en especies marinas como *Oryzias melastigma* (Yang et al. 2022) y alteraciones del nado, flotabilidad y ataxia en adultos de pez cebra (*Danio rerio*) (Barria, et al 2015). Los resultados del presente estudio indican que el AO tiene un impacto negativo y dosis-dependiente en la integridad de las células ciliadas de los neuromastos. Estas células se componen de proyecciones especializadas conocidas como estereocilios, constituidos por filamentos de actina. Un conjunto de estereocilios se vincula a un único kinocilio, que consiste en un microtúbulo central (Tanimoto et al., 2011), ambas estructuras, estereocilios y kinocilios, son esenciales para la función sensorial del neuromasto. El efecto negativo del ácido okadaico sobre estas células podría estar relacionado con su mecanismo de acción que inhibe la actividad de la fosfatasa 2A (PP2A), la cual entre otras funciones, podría incidir en los estados estructurales que definen la función celular de la actina, como la polimerización y despolimerización (Canals et al., 2012). Además, existen antecedentes que el AO afecta las proteínas de soporte de los microtúbulos de cultivos primarios de neuronas, lo que se traduce en una disminución en la función neuronal (Zhao et al., 2016). Estos antecedentes sugieren que el posible mecanismo de toxicidad en los neuromastos podría estar relacionado con la estabilidad estructural de las células que componen los neuromastos mediada por la inhibición de la actividad de la PP2A en proteínas.

Si bien en esta investigación se evaluó el daño de los neuromastos en un nivel netamente estructural, es importante considerar reportes como los de Lin et al. (2019) y Stawicki et al. (2014) que han demostrado cómo el daño en la estructura de las células ciliadas, causado por factores como el agua acidificada, puede afectar la capacidad mecanosensorial de estos órganos, por lo que un daño en la estructura de los neuromastos implicaría también un daño en la función de estos. Para evaluar el impacto del AO en la funcionalidad del sistema mecanorreceptor, Faria et al. (2020) analizaron cómo esta toxina afecta el comportamiento de escape de las larvas de peces, que está parcialmente regulado por el funcionamiento normal de los neuromastos. Los resultados mostraron que las respuestas de sobresalto y habituación (la capacidad de ignorar estímulos irrelevantes) no se alteraron después de la exposición a 0.036 ng/mL de esta toxina; una concentración por debajo de la cual nuestros resultados indicaron que no induciría daño estructural en los neuromastos (1 ng/mL) y, por lo tanto, se espera que no se detecten alteraciones funcionales. Así, nuestros hallazgos indican que las concentraciones más altas de ácido okadaico, que son ecológicamente relevantes, pueden causar daño a las células ciliadas. Este daño sugiere una posible alteración funcional de estos órganos en las larvas de peces que están expuestas a estas toxinas disueltas en su entorno acuático.

Al comparar el efecto combinado de la toxina y los parámetros ambientales se aprecia el papel sinérgico y/o aditivo de la temperatura con la toxina. Un sistema termorregulador estresado en cualquier organismo puede alterar la respuesta fisiológica a los agentes tóxicos y, en general, altas temperaturas exacerban los efectos de muchos tóxicos ambientales (Gordon, 2003). En otros peces, se ha observado que el aumento de la temperatura del agua está asociado con un incremento en la toxicidad aguda de sustancias como el paracetamol, enrofloxacin y clortetraciclina. Este fenómeno se atribuye probablemente a cambios en la toxicocinética de estas sustancias, es decir, en cómo son absorbidas, distribuidas, metabolizadas y excretadas en el cuerpo de los peces (Kim et al. 2009). En esta experiencia en dos de los tres experimentos realizados, la combinación temperatura y AO resultaron en una disminución en la cantidad de células ciliadas viables en comparación con las condiciones normales con la presencia de la toxina. Adicionalmente, en el experimento 1, estas variaciones fueron significativas incluso al compararlas con los efectos de la salinidad, lo que sugiere que la interacción entre la temperatura y el AO puede potenciar los efectos adversos

en la integridad de los neuromastos. Lo anterior difiere con lo observado por Xu et al. (2004), quienes reportan que altas temperaturas podrían mitigar los efectos del AO mediante la hiperfosforilación de proteínas citoesqueléticas, lo que implicaría una disminución en el efecto del AO cuando se aplica junto con un aumento térmico. Sin embargo, es importante destacar que este estudio de Xu et al. (2004) se realizó en cultivos de células (neuroblastomas), no en organismos completos como en esta experiencia en que se trabajó con larvas, por lo que la respuesta podría variar. Mientras que los experimentos en cultivos celulares ofrecen un entorno controlado y una comprensión detallada de las respuestas a nivel molecular, los estudios en organismos completos proporcionan una perspectiva más integrada al considerar las interacciones entre los sistemas biológicos y el entorno. Además, las condiciones experimentales utilizadas por Xu et al. (2004), incluyendo la concentración de toxina, el tiempo de exposición y la temperatura, fueron mucho más altas que las utilizadas en este estudio (25 ng/mL, 10 h y 42°C). Por lo tanto, las diferencias en los resultados podrían deberse a estas discrepancias en las condiciones experimentales y no reflejar necesariamente lo que ocurre en el entorno natural de las larvas de anchoveta que se intentó replicar en el laboratorio.

Dentro de las características del AO, destaca su estabilidad térmica y una degradación relativamente lenta bajo la radiación solar natural, pudiendo permanecer en la columna de agua durante más de 20 días (Pan et al. 2020; Jimenez, 2019). La mayoría de las floraciones de algas nocivas (FAN) reportadas en el centro-sur de Chile han ocurrido en periodos de primavera-verano, donde suele ocurrir un aumento en la temperatura del agua de mar (Barría et al. 2022). Esto hace posible que un evento de FAN con producción de AO en épocas de primavera-verano coincida con el periodo final del desove de la anchoveta. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que es posible que esta toxina induzca daño a los neuromastos y que, además, este daño podría ser mayor en la medida que avanza el periodo reproductivo. El deterioro de estos órganos sensoriales podría comprometer la capacidad de las larvas para responder a estímulos ambientales clave, lo que a su vez podría afectar su supervivencia. En una perspectiva más amplia, estos resultados subrayan la importancia de considerar múltiples factores ambientales (e.g. variaciones en la temperatura y salinidad) al estudiar los efectos de toxinas marinas sobre larvas de peces, aportando nuevo conocimiento respecto a cómo toxinas producidas en eventos FAN pueden interactuar con elementos

abióticos y generar repercusiones a los organismos con los que coexisten en la columna de agua.

6.- CONCLUSIONES

Los resultados presentados indican una variación estacional en el número de células viables en los neuromastos de las larvas de anchoveta. Este hallazgo sugiere que factores estacionales, como el período de desove, pueden influir en la calidad y el desarrollo de las larvas, lo que resalta la importancia de considerar el contexto temporal al estudiar la biología de esta especie.

Además, los resultados de este estudio sugieren que variaciones en la salinidad de la columna de agua pueden afectar la estructura e integridad de las células ciliadas en los neuromastos laterales de las larvas de anchoveta. Lo anterior destaca la sensibilidad de la línea lateral de las larvas de estos peces a los cambios en su entorno como la salinidad y, además, a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales.

Este estudio destaca el posible impacto del AO en los órganos sensoriales de las larvas de peces, particularmente en los neuromastos. Se concluye que la exposición al AO puede provocar daño crítico en estas estructuras sensoriales, comprometiendo potencialmente la capacidad de las larvas para responder a las señales ambientales e impactando su sobrevivencia.

Los resultados sugieren un efecto sinérgico entre el AO y la temperatura, lo que podría exacerbar los efectos perjudiciales en la integridad de los neuromastos. Esto subraya la importancia de considerar múltiples variables ambientales al evaluar los impactos de las toxinas marinas en las larvas de peces, sobre todo considerando un escenario con variaciones ambientales como el que se prevé con el cambio climático.

Con base en todo lo anterior se acepta la hipótesis planteada en este trabajo de investigación comprobando que la exposición a ácido okadaico (AO) combinado con variaciones de factores ambientales genera una alteración sobre la estructura de los neuromastos de larvas tempranas de anchoveta (*Engraulis ringens*).

Esta investigación contribuye a una mejor comprensión de las complejas interacciones entre toxinas marinas, factores ambientales y las larvas de peces, destacando la importancia de estudios integrales para la conservación y gestión de los ecosistemas marinos.

Referencias

- Anderson, D., Fensin, E., Gobler, C., Hoeglund, A., Hubbard, K., Kulis, D., Landsberg, J., Lefebvre, K., Provoost, P., Richlen, M., Smith, J., Solow, A., y Trainer, V. (2021). *Marine harmful algal blooms (HABs) in the United States: History, current status and future trends*. Harmful Algae, 102, 101975. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.101975>
- Anderson, C., Moore, S., Tomlinson, M., Silke, J., y Cusack, C. (2015). *Chapter 17: Living with Harmful Algal Blooms in a Changing World: Strategies for Modeling and Mitigating Their Effects in Coastal Marine Ecosystems*. En Coastal and Marine Hazards, Risks, and Disasters. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396483-0.00017-0>
- Arcos, D., S. Núñez & A. Acuña. (1996). *Variabilidad de pequeña escala en la zona nerítica del sistema de surgencia de Talcahuano (Chile centro-sur): Identificación y dinámica de retención larval*. Gayana Oceanología, 4, 21 - 58.
- Barría, C., Vásquez-Calderón, P., Lizama, C., Herrera, P., Canto, A., Conejeros, P., Beltrami, O., Suárez-Isla, B., Carrasco, D., Rubilar, I., Guzmán, L. Durán, R. y Oliva, D. (2022). *Spatial Temporal Expansion of Harmful Algal Blooms in Chile: A Review of 65 Years Records*. J. Mar. Sci. Eng., 10, 1868. <https://doi.org/10.3390/jmse10121868>
- Barrio, D., Avila, M., Alejo, A., Solimano, P., Piñuel, M., Boeri, P., Zubillaga, M. y Cantoni, G. (2015). *El pez cebra (Danio rerio) como un sistema modelo para la valoración biológica de las toxinas producidas por la marea roja*. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 8, 1-9. <http://hdl.handle.net/11336/44947>
- Basti, L., Hégaret, H. y Shumway, S. (2018). *Chapter 4: Harmful Algal Blooms and Shellfish*. En Harmful Algal Blooms: A Compendium Desk Reference. John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118994672.ch4>
- Bosch-Orea, C., Sanchís, J., Farré, M. y Barceló, D. (2017). *Analysis of lipophilic marine biotoxins by liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry in seawater from the Catalan Coast*. Anal Bioanal Chem, 409, 5451 – 5462. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0536-y>
- Bui, Q., Kim, H., Park, H. y Ki, J.-S. (2021). *Salinity Affects Saxitoxins (STXs) Toxicity in the Dinoflagellate Alexandrium pacificum, with Low Transcription of SXT-Biosynthesis Genes sxtA4 and sxtG*. Toxins, 13, 733. <https://doi.org/10.3390/toxins13100733>

- Bustos-Espinoza, L., Torres-Ramírez, P., Figueroa, S., González, P., Pavez, M., Jerez, R., Saldias, G., Espinoza, C. y Galán, A. (2024). *Biogeochemical Response of the Water Column of Concepción Bay, Chile, to a New Regime of Atmospheric and Oceanographic Variability*. *Geosciences*, 14(5), 125. <https://doi.org/10.3390/geosciences14050125>
- Canals, D., Roddy, P., y Hannun, Y. (2012). *Protein phosphatase 1 α mediates ceramide-induced ERM protein dephosphorylation: a novel mechanism independent of phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate (PIP2) and myosin/ERM phosphatase*. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 10145 - 10155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.306456>
- Castro, L., Claramunt, G., Krautz, M., Llanos-Rivera, A. y Moreno, P. (2009). *Egg trait variation in anchoveta *Engraulis ringens*: a maternal response to changing environmental conditions in contrasting spawning habitats*. *Mar Ecol Prog Ser*, 381, 237 - 248. <https://doi.org/10.3354/meps07922>
- Castro, L., Morin, V., Tiznado, O., Miranda, A., Soto, S., y Gonzalez, M. (2021). *Effects of salinity changes on hatching, hatching-gene expression, and hatching-enzyme expression in anchoveta *Engraulis ringens* eggs*. *Mar Ecol Prog Ser*, 658, 181–194. <https://doi.org/https://doi.org/10.3354/meps13548>
- Castro, L., González, V., Claramunt, G., Barrientos, P. y Soto, S. (2020). *Stable isotopes ($\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$) seasonal changes in particulate organic matter and in different life stages of anchoveta (*Engraulis ringens*) in response to local and large scale oceanographic variations in north and central Chile*. *Progress in Oceanography*, 186, 102342. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2020.102342>
- Chen, J., Han, T., Li, X., He, X., Wang, Y., Chen, F., Song, X., Zhou, D. y Wang, X. (2018). *Occurrence and distribution of marine natural organic pollutants: Lipophilic marine algal toxins in the Yellow Sea and the Bohai Sea, China*. *Science of The Total Environment*, 612, 931 – 939. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.304>
- Christensen, V. y Khan, E. (2020). *Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin*. *Science of the Total Environment*, 736, 139515. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139515>

- Collazos-Lasso, L., Gutierrez-Espinosa, M. y Restrepo-Betancour, L. (2014). *Supervivencia de larvas de cachama blanca, Piactus brachypomus Cuvier 1818, sometidas a cambios experimentales de temperatura*. Orinoquia, 18, 193 – 197.
- Corriere, M., Baptista, M., Paula, J., Repolho, T., Rosa, R., Reis Costa, P. y Soliño, L. (2020). *Impaired fish swimming performance following dietary exposure to the marine phycotoxin okadaic acid*. Toxicon, 179, 53 – 59. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.02.022>
- Cubillos, L. y Arancibia, H. (1993). *On the seasonal growth of common sardine (Strangomera bentincki) and anchovy (Engraulis ringens) off Talcahuano, Chile*. Revista de Biología Marina, 28, 43 - 49.
- Cubillos, L., Arcos, D., Bucarey, D. y Canales, M. (2001). *Seasonal growth of small pelagic fish off Talcahuano, Chile (37°S, 73°W): a consequence of their reproductive strategy to seasonal upwelling?*. Aquatic Living Resources, 14, 115 – 124. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(01\)01112-3](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(01)01112-3)
- Cubillos, L., Castro, L. y C Oyarzún. (2005). Evaluación de stock desovante de anchoveta y sardina común entre la V y X Regiones, año 2004. Informe Final. Proyecto FIP 2004, 3, 1-130
- d'Alençon, C., Peña, O., Wittmann, C., Gallardo, V., Jones, R., Loosli, F., Liebel, U., Grabher, C. y Allende, M. (2010). *A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish*. BMC Biol, 8, 151. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-151>
- Díaz, P., Álvarez, G., Pizarro, G., Blanco, J. y Reguera, B. (2022). *Lipophilic Toxins in Chile: History, Producers and Impacts*. Mar. Drugs, 20, 122. <https://doi.org/10.3390/md20020122>
- Faria, M., Wu, X., Luja-Mondragón, M., Prats, E., Gómez-Oliván, L., Piña, B. y Raldúa, D. (2020). *Screening anti-predator behaviour in fish larvae exposed to environmental pollutants*. Science of The Total Environment, 714, 136759. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136759>
- Figuroa, D., Ríos, J., Araneda, O., Contreras, H., Concha, M. y García, C. (2023) *Oxidative Stress Parameters and Morphological Changes in Japanese Medaka (Oryzias latipes) after Acute Exposure to OA-Group Toxins*. Life, 13, 15. <https://doi.org/10.3390/life13010015>

- Froehlicher, M., Liedtke, A., Groh, K.J., Neuhauss, S.C., Segner, H., y Eggen, R.I. (2009). *Zebrafish (Danio rerio) neuromast: Promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies*. Aquatic toxicology, 95, 307 - 319.
- Fuentes, C., Clement, A. y Aguilera, Al. (2008). *Summer Alexandrium catenella bloom and the impact on fish farming in the XI Aysén Region, Chile*. En: International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 183 - 186.
- Ghysen, A. y Dambly-Chaudière, C. (2004). *Development of the zebrafish lateral line*. Curr Opin Neurobiol, 14, 67 - 73. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.01.012>
- Glibert, P., Allen, J., Artioli, Y., Beusen, A., Bouwman, L., Harle, J., Holmes, R., Holt, J., (2014). *Vulnerability of coastal ecosystems to changes in harmful algal bloom distribution to climate change: projections based on model analysis*. Global Change Biology, 20, 3845 – 3858. <https://doi.org/10.1111/gcb.12662>
- González-Reyes, Á., Jacques-Coper, M., Bravo, C., Rojas, M., y Garreaud, R. (2023). *Evolution of heatwaves in Chile since 1980*. Weather and Climate Extremes, 41, 100588. <https://doi.org/10.1016/j.wace.2023.100588>
- Gordon, C. (2003). *Role of environmental stress in the physiological response to chemical toxicants*. Environmental Research, 92, 1 – 7. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(02\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(02)00008-7)
- Hattenrath-Lehmann, T., Lusty, M., Wallace, R., Haynes, B., Wang, Z., Broadwater, M., Deeds, J., Morton, S., Hastback, W., Porter, L., Chytalo, K. y Gobler, C. (2018). *Evaluation of Rapid, Early Warning Approaches to Track Shellfish Toxins Associated with Dinophysis and Alexandrium Blooms*. Marine Drugs, 16, 28. <https://doi.org/10.3390/md16010028>
- He, X., Chen, J., Wu, D., Wang, D., Xin, X., Liu, L., Sun, P. y Wang, P. (2023). *Occurrence, distribution, source, and influencing factors of lipophilic marine algal toxins in Laizhou Bay, Bohai Sea, China*. Marine Pollution Bulletin, 150, 110789. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110789>.
- Hernández, P., Moreno, V., Olivari, F. y Allende, M. (2006). *Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (Danio rerio)*.

- Hear Res. 2006 Mar;213(1-2):1-10. doi: 10.1016/j.heares.2005.10.015. Epub 2005 Dec 28. PMID: 16386394.
- Hinder, S., Hays, G., Edwards, M., Roberts E., Walnes, A. y Gravenor, B. (2012). *Changes in marine dinoflagellate and diatom abundance under climate change*. Nature Climate Change, 2, 271 – 275. <https://doi.org/10.1038/nclimate1388>
- Hung, G-Y., Pan, Y-C., Horng, J-L. y Lin, L-Y. (2023). *Sublethal effects of methylmercury on lateral line sensory and ion-regulatory functions in zebrafish embryos*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 271, 109700. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109700>
- Jacob, B., Tapia, F., Quiñones, R., Montes, R., Sobarzo, M., Schneider, W., Daneric, G., Morales, C., Montero, P. & González, H. (2018). *Major changes in diatom abundance, productivity, and net community metabolism in a windier and dryer coastal climate in the southern Humboldt Current*. Progress in oceanography, 168, 196-209. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.10.001>
- Kamiyama, T., Nagai, S., Suzuki, T. y Miyamura, K. (2010). *Effect of temperature on production of okadaic acid, dinophysistoxin-1, and pectenotoxin-2 by Dinophysis acuminata in culture experiments*. Aquat Microb Ecol, 60, 193 - 202. <https://doi.org/10.3354/ame01419>
- Kibler, S., Tester, P., Kunkel, K., Moore, S. y Litaker, R. (2015). *Effects of ocean warming on growth and distribution of dinoflagellates associated with ciguatera fish poisoning in the Caribbean*. Ecological Modelling, 316, 194 - 210. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.08.020>
- Kim, H. (2006). *Mitigation and Controls of HABs*. En Ecology of Harmful Algae, 189, 327–338. https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8_25
- Kim, J., Park, J., Kim, P., Lee, C., Choi, K. y Choi, K. (2010). *Implication of global environmental changes on chemical toxicity-effect of water temperature, pH, and ultraviolet B irradiation on acute toxicity of several pharmaceuticals in Daphnia magna*. Ecotoxicology 19, 662 – 669. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0440-0>
- Llanos-Rivera, A. y Castro L. (2004). *"Latitudinal and Seasonal Egg-Size Variation of the Anchoveta (Engraulis ringens) Off the Chilean Coast"*, Fishery Bulletin, 102, 207 – 212.

- Llanos-Rivera, A. y Castro, L. (2006). *Inter-population differences in temperature effects on Engraulis ringens yolk-sac larvae*. Mar Ecol Prog Ser, 312, 245 – 253. <https://doi.org/10.3354/meps07922>
- Llanos-Rivera, A., Herrera, G., Tarifeño, E. y Castro, L. (2014). *Development of free neuromasts in Engraulis ringens and Strangomera bentincki (Teleostei, Clupeiformes) early larvae*. Lat. Am. J. Aquat. Res., 42, 264 – 270. <http://dx.doi.org/10.3856/vol42-issue1-fulltext-22>.
- Lin, L., Hung, G., Yeh, Y., Chen, S. y Horng, J. (2019). *Acidified water impairs the lateral line system of zebrafish embryos*. Aquatic Toxicology, 217, 105351. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105351>
- Lin, L., Kantha, P. y Horng, J. (2023) *Toxic effects of polystyrene nanoparticles on the development, escape locomotion, and lateral-line sensory function of zebrafish embryos*. Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology, 272, 109701. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109701>
- Liu, Y., Yu, R., Kong, F., Li, C., Dai, L., Chen, Z. y Zhou, M. (2017). *Lipophilic marine toxins discovered in the Bohai Sea using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Chemosphere, 183, 380 – 388. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.073>.
- Louzao, M., Vilariño, N., Vale, C., Costas, C., Cao, A., Raposo-Garcia, S., Vieytes, M. y Botana, L. M. (2022). *Current trends and new challenges in marine phycotoxins*. Marine Drugs, 20, 198. <https://doi.org/10.3390/md20030198>
- MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., y Selwood, A. (2004). *Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves*. Toxicon, 44, 901-918. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.08.020>
- Mardones, C. (2010). *Seguimiento in vivo del proceso regenerativo de la línea lateral caudal en pez cebra adulto (Danio rerio)* (Tesis de pregrado para optar al título de Ingeniera en Biotecnología Molecular). Universidad de Chile. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/192537>
- Miles, C., Wilkins, A., Munday, R., Dines, M., Hawkes, A., Briggs, L., Sandvik, M., Jensen, D., Cooney, J., Holland, P., Quilliam, M., MacKenzie, A., Beuzenberg, V. y Towers,

- N. (2004). *Isolation of pectenotoxin-2 from Dinophysis acuta and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities*. *Toxicon*, 43, 1 – 9. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.10.003>
- Montory, J., Pechenik, J., Diederich, C. y Chaparro, O. (2014). *Effects of Low Salinity on Adult Behavior and Larval Performance in the Intertidal Gastropod Crepipatella peruviana (Calyptraeidae)*. *PLoS ONE*, 9, e103820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103820>
- Nishikawa, S. y Sasaki, F. (1996). *Internalization of styryl dye FM1-43 in the hair cells of lateral line organs in Xenopus larvae*. *J. Histochem Cytochem.* 44, 733 – 741. <https://doi.org/10.1177/44.7.8675994>
- Oliver, E. (2019). *Mean warming not variability drives marine heatwave trends*. *Clim Dyn*, 53, 1653 – 1659. <https://doi.org/10.1007/s00382-019-04707-2>
- Pan, L., Chen, J., He, X., Zhan, T. y Shen, H. (2020). *Aqueous photodegradation of okadaic acid and dinophysistoxin-1: Persistence, kinetics, photoproducts, pathways, and toxicity evaluation*. *Science of The Total Environment*, 743, 140593. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140593>.
- Paredes-Mella, J., Mardones, J., Norambuena, L., Fuenzalida, G., Labra, G. y Nagai, S. (2022). *Toxic Dinophysis acuminata in southern Chile: A comparative approach based on its first local in vitro culture and offshore-estuarine bloom dynamics*. *Progress in Oceanography*, 209, 102918. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2022.102918>
- Paz, B., Riobó, P., Fernández, M., Fraga, S., Franco, J. (2004). *Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates Protoceratium reticulatum and Lingulodinium polyedrum in culture*. *Toxicon*, 44(3), 251 - 258. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.021>
- Peloggia, J., Münch, D., Meneses-Giles, P., Romero-Carvajal, A., McClain, M., Pan, Y. A., y Piotrowski, T. (2020). *Adaptive cell invasion maintains organ homeostasis*. bioRxiv [Preprint]. <https://doi.org/10.1101/2020.12.01.404954>
- Peloggia, J., Münch, D., Meneses-Giles, P., Romero-Carvajal, A., Lush, M., Lawson, N., McClain, M., Pan, A. y Piotrowski, T. (2021). *Adaptive cell invasion maintains lateral*

- line organ homeostasis in response to environmental changes*. Developmental Cell, 56, 1296 - 1312. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.027>
- Peloggia, J., Lush, M., Tsai, YY., Wood, C. y Piotrowski, T. (2024). *Environmental and molecular control of tissue-specific ionocyte differentiation in zebrafish*. bioRxiv [Preprint]. <https://doi.org/10.1101/2024.01.12.575421>
- Pizarro, G., Alarcón, C., Franco, J., Palma, M., Escalera, L., Reguera, B., Vidal, G. y Guzman, L. (2011). *Distribución espacial de Dinophysis spp. y detección de toxinas DSP en el agua mediante resinas DIAION (verano 2006, Región de Los Lagos, Chile)*. Cienc. Tecnol. Mar, 34, 31-48.
- Politis, S., Mazurais, D., Servili, A., Zambonino-Infante, J-L., Miest, J., Tomkiewicz, J. y Butts, I. (2018). *Salinity reduction benefits European eel larvae: Insights at the morphological and molecular level*. PLoS One, 13, e0198294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198294>
- Pörtner, H. y Farrell, P. (2008). *Physiology and Climate Change*. Science, 322, 690 – 692. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1163156>
- Reynhout, S. y Janssens, V. (2019). *Physiologic functions of PP2A: Lessons from genetically modified mice*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1866, 31 – 50. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.07.010>
- Sar, E., Ferrario, M., & Reguera, B. (2002). *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía.
- Schneider, W., Donoso, D., Garcés-Vargas, J. y Escribano, R. (2017). *Water-column cooling and sea surface salinity increase in the upwelling region off central-south Chile driven by a poleward displacement of the South Pacific High*. Progress in Oceanography, 151, 38-48. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2016.11.004>
- Seguel, M., Sfeir, A., y Albornoz, V. (2010). *Floraciones de microalgas tóxicas en la región de Aysén y su relación con larvas de peces*. Ciencia y Tecnología del Mar, 33, 31-42.
- Seremi de Salud del Biobio. (2022). Resolución exenta 2418 (19.10.2022). Por la cual se establece la prohibición de la extracción de recursos bivalvos. Departamento de acción sanitaria. Unidad de seguridad alimentaria.

- Sernapesca. (2022). *Anuario Estadístico de Pesca*. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, Chile.
<https://anuario.sernapesca.dataobservatory.net/>
- Soto-Mendoza, S., Castro, L., y Llanos-Rivera, A. (2010). *Variabilidad espacial y temporal de huevos y larvas de Strangomera bentincki y Engraulis ringens, asociados a la desembocadura del río Itata, Chile*. Revista de biología marina y oceanografía, 45, 471-487. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572010000300012>
- Stawicki, T., Owens, K., Linbo, T., Reinhart, K., Rubel, E. y Raible, D. (2014). *The zebrafish merovingian mutant reveals a role for pH regulation in hair cell toxicity and function*. Dis Model Mech, 7, 847 - 856. <https://doi.org/10.1242/dmm.016576>
- Tanimoto, M., Ota, Y., Inoue, M. y Oda, Y. (2011). *Origin of Inner Ear Hair Cells: Morphological and Functional Differentiation from Ciliary Cells into Hair Cells in Zebrafish Inner Ear*. Journal of Neuroscience, 31, 3784 – 3794.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5554-10.2011>
- Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U. y Cembella, A. (2009). *Azadinium spinosum gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins*. European Journal of Phycology, 44, 63-79.
<https://doi.org/10.1080/09670260802578534>
- Trainer, V., Moore, S., Hallegraeff, G., Kudela, R., Clement, A., Mardones, J., y Cochlan, W. (2020). *Pelagic harmful algal blooms and climate change: Lessons from nature's experiments with extremes*. Harmful Algae, 91, 101591.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.009>
- Turner, J., Lincoln, J. y Cembella, A. (1998). *Effect of toxic and non-toxic dinoflagellate on copepods grazing, egg production and egg hatching success*. En: Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 379-381.
- Valdiglesias, V., Prego-Faraldo, M., Pásaro, E., Méndez, J. y Laffon, B. (2013). *Okadaic acid: more than a diarrhetic toxin*. Mar Drugs. 11, 4328 - 4349.
<https://doi.org/10.3390/md11114328>
- Varsamos, S., Nebel, C. y Charmantier, G. (2005). *Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A:

- Molecular & Integrative Physiology, 141, 401 – 429.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.01.013>
- Vásquez, P., Llanos-Rivera, A., y Castro, L. (2010). *Abnormalities during the embryonic development in araucanian herring, Strangomera bentincki, in natural environment*. Revista de biología marina y oceanografía, 45, 177 - 185.
<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572010000100020>
- Velasco, J., Gutiérrez-Cánovas, C., Botella-Cruz, M., Sánchez-Fernández, D., Arribas, P., Carbonell, JA., Millán, A. y Pallarés, S. (2018). *Effects of salinity changes on aquatic organisms in a multiple stressor context*. Phil. Trans. R. Soc., 374, 20180011.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0011>
- Wang, H., Kim, H., Park, H. y Ki, J. (2022). *Temperature influences the content and biosynthesis gene expression of saxitoxins (STXs) in the toxigenic dinoflagellate Alexandrium pacificum*. Science of The Total Environment, 802, 149801.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149801>.
- Wang, J., Li, R., Liu, B., Zhang, Q., Wang, X., Zhu, Y. y Zhang, Y. (2023). *Occurrence and distribution of lipophilic marine algal toxins in the coastal seawater of Southeast China and the South China Sea*. Marine Pollution Bulletin, 187, 114584.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114584>
- Wells, M., Karlson, B., Wulff, A., Kudela, R., Trick, C., Asnaghi, V., Berdalet, E., Cochlan, W., Davidson, K., De Rijcke, M., Dutkiewicz, S., Hallegraeff, G., Flynn, K., Legrand, C., Paerl, H., Silke, J., Suikkanen, S., Thompson, P. y Trainer, V. (2020). *Future HAB science: Directions and challenges in a changing climate*. Harmful Algae, 91, 101632.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101632>
- Xu, Y., Zhang, Y., Zhang, A., Zhang, Q., Wu, T. y Wang, J. (2004). *Attenuation of okadaic acid-induced hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins by heat preconditioning and its possible underlying mechanisms*. Cell Stress Chaperones, 9, 304 - 312.
<https://doi.org/10.1379%2FCSC-23R1.1>
- Yang, Y., Li, A., Qiu, J., Yan, W., Han, L., Li, D. y Yin, C. (2023). *Effects of lipophilic phycotoxin okadaic acid on the early development and transcriptional expression of marine medaka Oryzias melastigma*. Aquatic Toxicology, 260, 106576.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106576>

Zhao, L., Xiao, Y., Wang, X., Pei, J., y Guan, Z. (2016). *Influence of okadaic acid on hyperphosphorylation of tau and nicotinic acetylcholine receptors in primary neurons*. Experimental Biology and Medicine, 241, 1825 – 1833.
<https://doi.org/10.1177/1535370216650759>