



Universidad de Concepción

Evaluación de efectos neurotóxicos de la toxina asociada a FAN Yesotoxina, en larvas de *Danio rerio*.

Tesis presentada en la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Marina y Acuicultura

Por

Paula Andrea Silva Villa

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Profesora Guía

Alejandra Justina Llanos Rivera

06 de abril de 2026

Concepción, Chile

Universidad de Concepción Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Profesora Guía:

Dra. Alejandra Llanos Rivera
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

Comisión evaluadora:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

Dra. Javiera De la Paz Montt
Departamento de Biología Celular
Universidad de Concepción

Coordinador del seminario de título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

DEDICATORIA

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han sido parte de este importante proceso, que marca el cierre de una etapa tan desafiante como significativa en mi vida: la finalización de mi carrera de Ingeniería en Biotecnología Marina y Acuicultura.

En primer lugar, agradezco sinceramente a mi profesora Alejandra, quien no solo fue mi guía académicamente, sino que también me sostuvo en los momentos más difíciles. Su paciencia, dedicación y confianza en mí fueron fundamentales para no rendirme y seguir adelante.

A mi familia, por su amor incondicional, por ser mi refugio y mi fuerza en cada paso de este camino. Gracias por levantarme y bromear conmigo cuando lo necesité, por creer en mí incluso en mis días más inciertos y por celebrar cada pequeño logro como si fuera el más grande.

A mi pareja, Rafael, por ser mi hogar en medio de todo este proceso. Gracias por tu amor profundo, constante y sincero, por sostenerme con dulzura en los momentos de cansancio y por recordarme, una y otra vez, la mujer fuerte y capaz que soy. A tu lado aprendí a confiar en mí misma, a atreverme y a seguir incluso cuando el camino parecía difícil.

A Patricio, por abrirme las puertas del laboratorio y por enseñarme con tanta dedicación. Gracias por cada hora compartida, por tu paciencia y por esas largas jornadas de PCR que no solo formaron a una estudiante, sino también a la persona que hoy soy.

A mi amiga Ellie, por ser luz en este camino. Gracias por las risas, el apoyo incondicional y por estar presentes incluso en los días más exigentes.

A mis profesores que los admiro tanto, profesor Fernando Cruzat y profesora Allisson Astuya, gracias por plantar en mí la semilla de la curiosidad y el amor por la ciencia.

Y finalmente, a mis fieles compañeras, mi gatita Zoe y mi perrita Mía, por su amor puro y silencioso, por su compañía constante en tantas noches de estudio y por recordarme, sin palabras, la importancia de los pequeños momentos. Y a mi gatito que hoy habita en el cielo, gracias por el amor que aún perdura en mí como una caricia eterna; porque, aunque ya no estés físicamente, sigues acompañando cada uno de mis pasos desde un lugar más infinito.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
HIPOTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECIFICOS	10
METODOLOGIA	11
Obtención de embriones y larvas de pez cebra	11
Obtención de la toxina y preparación de soluciones experimentales	12
Objetivo 1. Evaluar los efectos morfológicos de la exposición a yesotoxina mediante la medición de la distancia interocular y del área del mesencéfalo en larvas de pez cebra.	12
1.1 Determinación de la concentración óptima de etanol como control positivo.	12
1.2 Evaluación de la reversibilidad del efecto del etanol.	12
1.3 Evaluación de los efectos de la yesotoxina	13
Objetivo 2. Cuantificar la actividad locomotora de larvas de pez cebra expuestas a yesotoxina mediante ensayos de pulsos de luz-oscuridad.	13
2.1. Actividad locomotora	14
Objetivo 3. Cuantificar la expresión de ARNm de los genes <i>ache</i>, <i>caspasa 8</i> y <i>mbp</i> en larvas de pez cebra expuestas a yesotoxina.	15
3.1 Extracción de ARN, digestión con DNasa I y purificación.	15
3.2 Síntesis de ADNc	16
3.3 qPCR en tiempo real	16
Análisis estadístico	17
RESULTADOS	19
Distancia interocular y tamaño del área del mesencéfalo de larvas expuestas a YTX.	20
Actividad locomotora en larvas expuestas a YTX	22
Elección del gen para normalización y Expresión de ARNm.	24
DISCUSIÓN	28
BIBLIOGRAFÍA	33

RESUMEN

La yesotoxina constituye un problema emergente debido a su presencia en floraciones algales nocivas y su acumulación en mariscos, junto con la limitada comprensión de sus efectos neurotóxicos, los cuales se evaluaron en esta tesis a nivel morfológico, conductual y molecular.

La metodología consistió en la exposición por inmersión de larvas de 5 días post-fertilización a dos concentraciones de YTX (0,38 µg/mL, correspondiente al límite regulatorio, y 0,04 µg/mL, concentración 10 veces más baja), utilizando etanol como control positivo. Se evaluaron parámetros morfológicos mediante la medición de la distancia interocular y el área del mesencéfalo, la actividad locomotora en ensayos de pulsos de luz-oscuridad, y la expresión génica de marcadores asociados a neurotoxicidad (acetilcolinesterasa, proteína básica de mielina y caspasa 8) mediante qPCR en tiempo real.

A nivel morfológico, se observó una disminución significativa de la distancia interocular y del área del mesencéfalo, indicando efectos sobre el neurodesarrollo. Conductualmente los resultados evidenciaron que la exposición a YTX induce alteraciones significativas en el comportamiento locomotor, caracterizadas por una disminución inicial de la actividad y respuestas alteradas frente a estímulos de luz-oscuridad, lo que sugiere disfunción neuromotora. En el análisis molecular, un hallazgo interesante fue la inestabilidad en los genes de referencia utilizados (18S, G6PDH y Factor de elongación) siendo el gen 18S el más estable. Usando este gen para cuantificar la expresión génica no se detectaron cambios significativos en la expresión de *ache*, mientras que se observó un aumento en la expresión de *mbp* y, especialmente, de caspasa 8 sugiriendo la activación de apoptosis. En conjunto, los resultados demuestran que la yesotoxina induce efectos neurotóxicos en larvas de pez cebra, evidenciados a nivel morfológico, conductual y molecular, validando el uso de *Danio rerio* como un bioensayo para la evaluación de neurotoxicidad de biotoxinas marinas.

INTRODUCCIÓN

El fitoplancton comprende diversas algas microscópicas fotosintéticas, incluyendo dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias. Estos microorganismos desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas marinos, entre algunos roles está el servir como alimento vital para las larvas de crustáceos y peces comerciales en desarrollo. Sin embargo, algunas especies de fitoplancton pueden ser peligrosas, ya que pueden multiplicarse rápidamente bajo condiciones específicas alcanzando densidades que pueden incluso decolorar la superficie del océano, fenómeno conocido como Floraciones Algaes Nocivas (FANs; FAO, 2005). A veces conlleva la producción de compuestos tóxicos que los organismos filtradores de microalgas pueden bioacumular en sus tejidos sin daños, incorporándose a las cadenas tróficas que alimentan al ser humano (FAO, 2005).

Las toxinas marinas se categorizan según su mecanismo de acción y los efectos clínicos que producen en humanos. Se distinguen tres grupos principales (FAO, 2005):

Veneno Paralizante de Mariscos (VPM): Producido por microalgas como *Alexandrium catenella*, cuya toxina principal es la Saxitoxina. Esta toxina bloquea los canales de sodio, causando parálisis muscular y potencialmente la muerte por fallo respiratorio, cardíaco o del sistema nervioso central.

Veneno Amnésico de Mariscos (VAM): Originado por microalgas como *Pseudonitzschia australis*, que produce la toxina Ácido Domoico. Esta toxina puede causar amnesia temporal o permanente en seres humanos.

Biotoxinas Marinas Lipofílicas: Anteriormente conocidas como Veneno Diarreico de Mariscos (VDM), son producidas por especies como *Dinophysis sp.* Causa diarrea severa y deshidratación en humanos. Se dividen en cuatro subgrupos: Ácido Okadaico y Dinofisistoxinas, Pectenotoxinas, Azaspirácidos y Yesotoxinas.

Otras biotoxinas menos comunes incluyen las Brevetoxinas o Veneno Neurotóxico de Mariscos (VNM), la Ciguatera (CTX) asociada al consumo de peces, las Palitoxinas y los Espirólidos (Vivanco, 2022).

La detección e identificación de toxinas marinas ha sido un desafío constante para la ciencia y las autoridades responsables del control y monitoreo en productos pesqueros. Actualmente existen tres métodos para estudiarlas: analíticos, biológicos y químicos (Dillon et al., 2021). Entre estos métodos están la cromatografía líquida UV, cromatografía líquida de fluorescencia, ensayos funcionales in vitro, biosensores de afinidad y ELISA (Soliño, 2015).

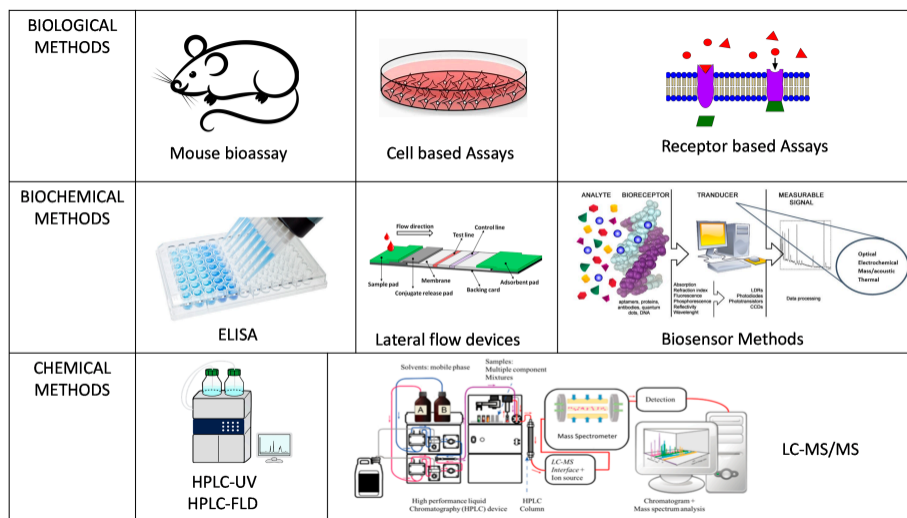


Figura 1: Resumen esquemático de los distintos métodos de análisis de biotoxinas marinas tomado de Dillon et al. (2021).

Los modelos biológicos, como el bioensayo en ratón, han sido fundamentales para proporcionar una visión integral de la toxicidad, especialmente en la detección de toxinas marinas. Sin embargo, plantea serias preocupaciones éticas y científicas. La experimentación animal no solo contradice el principio de las 3R Reemplazar, Reducir, Refinar; (Russell & Burch 1959) sino que también suscita interrogantes sobre la especificidad y sensibilidad del método, dado que los resultados a menudo se basan en observaciones subjetivas.

El ensayo de ratón in vivo (AOAC, 1990) está validado internacionalmente y está normado en Chile como herramienta obligatoria de certificación para las toxinas paralizantes, diarreicas, amnésicas y lipofílicas (Guzmán & Suárez 1998). Luego de detectar la presencia de toxinas se utiliza un método confirmatorio, en el caso de toxinas marinas lipofílicas, como por ejemplo las Yesotoxinas (YTXs) es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) la que entrega una mayor especificidad y sensibilidad. En el caso de la YTX el límite regulatorio es de 3,75 mg de equivalentes de YTX/Kg (Subpesca, 2024).

Específicamente, el estudio del mecanismo de acción de las yesotoxinas (YTXs), han mostrado su efecto en el timo y el sistema inmunológico. A nivel celular, inhiben las fosfodiesterasas en linfocitos T humanos (Alfonso et al., 2003), y alteran las funciones de los macrófagos (Orsi et al., 2010). Además, inducen apoptosis en células hepáticas humanas (Pang et al., 2012) y provocan cambios significativos en neuronas del cerebelo y células del mioblasto, incluyendo contracción nuclear, condensación de cromatina y destrucción del citoesqueleto (Bianchi, 2004). Estos hallazgos demuestran el amplio espectro de efectos de las YTX en diversos tipos de células, afectando desde el sistema inmunológico hasta el tejido nervioso y muscular.

Estas toxinas que son producidas principalmente por el dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*, representan una amenaza persistente y predominante para la industria de la mitilicultura en el sur de Chile, particularmente en la Región de Los Lagos, donde estudios de monitoreo prolongado han identificado a las toxinas paralizantes como las responsables del 80,1% de las prohibiciones de captura de bivalvos (Seguel, 2010).

La dinámica de acumulación de YTXs en especies como *Mytilus chilensis* presenta desafíos oceanográficos y regulatorios significativos; se ha documentado que floraciones moderadas de *P. reticulatum* ($2,2 \times 10^3$ células L^{-1}) pueden desencadenar concentraciones de toxina en tejido que oscilan entre 51 y 496 mg kg^{-1} , superando frecuentemente los límites de seguridad de la Unión Europea (3,75 mg YTX eq. kg^{-1} ; Díaz et al., 2022). Esta problemática se ve agravada por la variabilidad geográfica en zonas de alta importancia acuícola como el Estero de Reloncaví y el sistema de fiordos de Magallanes, donde la co-ocurrencia de YTXs con otros grupos de toxinas lipofílicas complica la gestión sanitaria.

Las yesotoxinas (YTX) fueron detectadas por primera vez en Chile en mejillones provenientes del Archipiélago de Chonos (Yasumoto y Takizawa, 2003). Posteriormente, mediante técnicas analíticas como la cromatografía acoplada a espectrometría de masas, se identificó que los principales productores son los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum*, *Gonyaulax polygramma* y *Gonyaulax spinifera* (Álvarez et al., 2011; Rodríguez et al., 2021). Las floraciones de *P. reticulatum* se han asociado directamente con la presencia de YTX en moluscos, registrándose a lo largo de la costa chilena. En el ambiente, las concentraciones disueltas en el agua han alcanzado hasta 422 pg L^{-1} en muestras de plancton frente a Bahía Arica (Krock et al., 2009). Asimismo, se han detectado YTX en tejidos de moluscos e invertebrados marinos con concentraciones entre 0,1 y 0,4 mg YTX kg^{-1} , y en eventos de mortalidad de organismos marinos como el calamar de Humboldt se han registrado 0,42 y 0,12 mg YTX kg^{-1} en vísceras (Álvarez et al., 2020). Más recientemente, durante una floración de *P. reticulatum* en el fiordo de Puyuhuapi en 2022, se reportaron niveles de hasta 9,42 mg YTX kg^{-1} en moluscos, superando el límite reglamentario y motivando la prohibición de cosecha en las regiones de Los Lagos y Aysén (Díaz, 2024).

Los peces han demostrado ser modelos eficaces para la identificación y caracterización de toxinas producidas por microalgas marinas y de agua dulce, dado que los modelos animales acuáticos presentan diversas ventajas prácticas. Por ejemplo, el embrión de pez cebra (*Danio rerio*) constituye un modelo toxicológico ampliamente utilizado, especialmente en estudios de toxicidad del desarrollo, debido a su pequeño tamaño, transparencia embrionaria, rápida embriogénesis y facilidad de mantenimiento en laboratorio. Su reducido tamaño permite la observación directa mediante microscopía óptica y la aplicación de ensayos de alto rendimiento, mientras que su tolerancia a diversos medios y disolventes facilita la evaluación experimental de toxinas. Asimismo, el creciente conocimiento de su genoma, junto con la disponibilidad de mutantes del desarrollo, posibilita la asociación de los efectos toxicológicos con genes y vías biológicas específicas (Berry et. al, 2007).

Estudios preliminares en larvas del pez cebra (*Danio rerio*) han evaluado los efectos fisiológicos y conductuales de las yesotoxinas (YTX). La exposición a concentraciones subletales evidenció alteraciones en la actividad locomotora y en la respuesta táctil, lo que sugiere posibles efectos teratogénicos y/o neurotóxicos. En particular, larvas de 4 días post-fertilización (dpf) expuestas por inmersión durante 24 h mostraron un aumento significativo de la actividad locomotora al inicio del periodo de oscuridad, mientras que tras tres días de exposición se observó una disminución en la respuesta táctil, indicando una posible afectación del sistema neuromotor (De la Paz et al., 2022). Adicionalmente, se ha reportado que la exposición aguda a YTX en concentraciones de 0,10µg/mL no produce letalidad ni edemas en larvas, pero interfiere con el desarrollo normal de la vejiga natatoria y afecta procesos de regeneración tisular, evidenciado mediante ensayos de amputación de la aleta caudal (De la Paz et al., 2022). Por otra parte, esta toxina en concentración de 0,38µg/mL induce alteraciones cardiovasculares y del desarrollo, incluyendo disminución de la frecuencia cardíaca y anomalías en el desarrollo vascular, en embriones expuestos vía inmersión. A altas concentraciones provocan mortalidad embrionaria, mientras que a bajas generan retraso vascular y reducción del tamaño cardíaco (Roa, 2025).

La neurotoxicidad es referida a los efectos adversos que las sustancias químicas inducen en el sistema nervioso, provocando daños funcionales o estructurales (Legradi et al., 2018). Específicamente, en el pez cebra se han establecido diferentes herramientas para evaluar neurotoxicidad, por ejemplo a. actividad locomotora, pruebas de aprendizaje memoria y la respuesta de sobresalto (Tierney, 2011); b. evaluaciones de muerte celular utilizando naranja de acridina e inmunohistoquímica, para detectar células apoptóticas y evaluar el daño neuronal (Regnault et al., 2016) y también c. estudios moleculares y genéticos, utilizando la PCR cuantitativa, secuenciación de ARN y edición con CRIPR-Cas9 para analizar los cambios de la expresión de genes e identificar alteraciones moleculares (Sipes et al., 2011). En particular, la cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) requiere la utilización de genes de referencia o genes normalizadores para corregir variaciones asociadas a la cantidad y calidad del ARN, la eficiencia de la retrotranscripción y las diferencias técnicas entre muestras. Estos genes, participan en funciones celulares esenciales y se espera que mantengan una expresión estable entre distintos tratamientos y condiciones experimentales. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que genes de referencia ampliamente utilizados pueden presentar variaciones significativas en su expresión dependiendo del tejido, el estado fisiológico y las condiciones experimentales, por lo que su estabilidad debe ser validada previamente para cada estudio (Vandesompele et al., 2002; Huggett et al., 2005). En organismos modelo como *Danio rerio*, genes como *18S*, *β-actina*, *EF1α* y *G6PDH* han sido frecuentemente empleados como controles internos, aunque su idoneidad depende de la estabilidad de su expresión bajo las condiciones específicas evaluadas. Por esta razón, la selección y validación de genes normalizadores constituye un paso fundamental para obtener resultados confiables en estudios de expresión génica mediante qPCR.

Entonces, la histórica dependencia del bioensayo en ratón para la evaluación de toxinas lipofílicas destinadas al consumo nacional ha generado una distorsión socioeconómica, al provocar cierres preventivos asociados a la detección de YTXs, pese a que estas no han demostrado toxicidad aguda por vía oral en humanos. Esta situación evidencia la necesidad de incorporar metodologías analíticas y biológicas más específicas y precisas para la gestión de eventos de floraciones algales nocivas asociadas a esta toxina. En este contexto, se propone el uso del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo de bioensayo experimental que permita evaluar posibles efectos neurotóxicos asociados a la exposición a estas toxinas, contribuyendo al desarrollo de herramientas de identificación de potenciales riesgos para la salud humana.

HIPOTESIS

La exposición vía inmersión a la toxina lipofílica yesotoxina, en concentraciones cercanas al límite regulatorio induce efectos neurotóxicos en larvas de pez cebra (*Danio rerio*).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos morfológicos, conductuales, y moleculares de la exposición a yesotoxina en larvas de pez cebra (*Danio rerio*).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar los efectos morfológicos de la exposición a yesotoxina mediante la medición de la distancia interocular y del área del mesencéfalo en larvas de pez cebra.
2. Cuantificar la actividad locomotora de larvas de pez cebra expuestas a yesotoxina a pulsos alternados de luz-oscuridad.
3. Cuantificar la expresión de ARNm de los genes *ache*, *caspasa 8* y *mbp* en larvas de pez cebra expuestas a yesotoxina.

METODOLOGIA

Obtención de embriones y larvas de pez cebra

Los reproductores de *Danio rerio* de la línea TAB5 (Figura 2) se mantuvieron en el Laboratorio de Toxicología Acuática en estanques de 25 litros bajo condiciones controladas, garantizando la calidad optima del agua mediante sistemas de filtración con luz ultravioleta y oxigenación constante. Además, también se controlaron los parámetros ambientales de los tanques como la temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$), conductividad ($500\text{-}700 \mu\text{S}/\text{cm}^3$) y pH (7.0-7.4). Estos reproductores se mantuvieron con fotoperiodos de luz/oscuridad (14h/10h), además de alimentación dos veces al día mediante pellets Zebra feed.

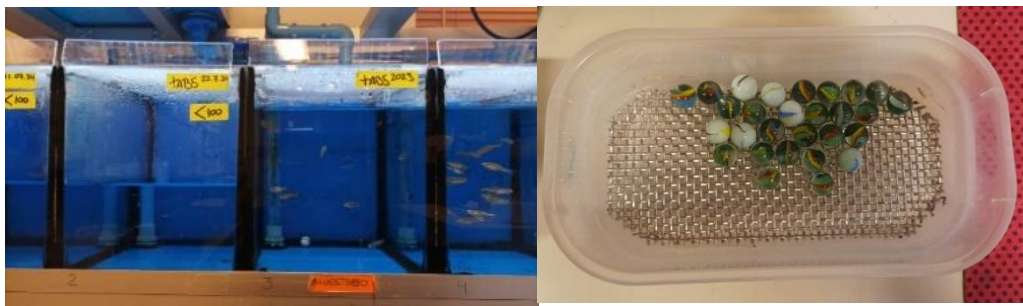


Figura 2: Acuarios con capacidad de 25 litros con ejemplares de *Danio rerio* (línea Tab5) y sistema de paridera con adición de piedras brillantes para inducir el desove de los peces y la obtención de embriones.

Para la obtención de los embriones de pez cebra, se colocaron recipientes especiales llamados parideras para inducir al desove (Figura 2). Los huevos fertilizados fueron recolectados con un tamiz de $500\mu\text{m}$ y cuidadosamente lavados para eliminar el resto de las heces y otros contaminantes. Posterior a eso se realizó la selección de los embriones con uniformidad, homogeneidad del corion y sin malformaciones mediante bajo lupa estereoscópica Stemi DV4 (Karl Zeiss).

La incubación de embriones para la obtención de larvas se hizo en placas Petri con medio de cultivo E3 (5Mm NaCl , 0.17mM KCl , 0.33 mM CaCl_2 , 0.33 mM MgSO_4) con azul de metileno. Estas placas se llevaron a una incubadora (VELP) a 28°C bajo el mismo fotoperiodo de los reproductores. Diariamente se la eliminaron ovas que no se desarrollaran correctamente hasta que se alcanzó el estadio larval de 5 días post fecundación. Las larvas a utilizar en los experimentos fueron seleccionadas cuidadosamente con el criterio de que su vejiga natatoria estuviese completamente inflada y sin alteraciones morfológicas.

Obtención de la toxina y preparación de soluciones experimentales

La solución estándar de yesotoxina fue obtenida desde el Nacional Research Council Canada a una concentración de 4,3 $\mu\text{mol/L}$ suspendida en metanol puro. La alícuotas se llevaron a sequedad con un concentrador de nitrógeno a 60 °C y aplicando un flujo constante de nitrógeno. Luego, la YTX pura se suspendió directamente en medio E3 con agitación constante hasta alcanzar concentraciones finales de 0,38 $\mu\text{g/mL}$ y 0,04 $\mu\text{g/mL}$ para los tratamientos experimentales. En cada experimento se incluyó un control negativo que correspondía a E3 (5Mm NaCl, 0.17mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄) y como control positivo etanol al 1,2% que se preparó desde una solución stock de pureza al 99%.

Objetivo 1. Evaluar los efectos morfológicos de la exposición a yesotoxina mediante la edición de la distancia interocular y del área del mesencéfalo en larvas de pez cebra.

1.1 Determinación de la concentración óptima de etanol como control positivo.

Con el objetivo de establecer la concentración adecuada de etanol a utilizar como control positivo en estos ensayos de neurotoxicidad, se evaluó su efecto sobre parámetros morfológicos en larvas de pez cebra, siguiendo criterios propuestos por Su et al. (2025). Grupos de 15 larvas de 5 pdf fueron expuestos durante 24 horas a los siguientes tratamientos: medio E3 (control negativo), etanol 1,2% y 1,5%. Finalizado el periodo de exposición, cada larva fue posicionada en orientación dorsal sobre un portaobjeto excavado, utilizando una pipeta para su manipulación, y observada inmediatamente bajo un aumento de 0,63X. Para cada larva se obtuvo imágenes de la región cefálica mediante una cámara digital acoplada a la lupa estereoscópica.

Las imágenes fueron posteriormente analizadas utilizando el software ImageJ, donde se midió la distancia interocular definida como la distancia entre los bordes internos más cercanos de cada ojo y el área del mesencéfalo, delimitando completamente su perímetro (Figura 5). Estos parámetros permitieron comparar los efectos de los tratamientos y definir la concentración de etanol más adecuada como control positivo para los ensayos posteriores.

1.2 Evaluación de la reversibilidad del efecto del etanol

Con el fin de determinar si los posibles efectos de YTX sobre parámetros morfológicos podrían ser o no reversibles se diseñó un ensayo de recuperación post-exposición con etanol. Para esto, 14 larvas fueron expuestas por 3 horas en una placa de 24 pocillos a dos concentraciones de etanol (1,2% y 1,5%), por triplicado. Post exposición fueron medidas y analizadas en el software ImageJ siguiendo metodología descrita en punto 1.1. Posteriormente, las larvas fueron transferidas a una nueva placa que contenía únicamente medio E3, donde permanecieron durante 24 horas para su recuperación. Tras este periodo, se procedió a la medición de la distancia interocular ya tamaño del mesencéfalo. Para ello, cada larva fue fotografiada y las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software image J.

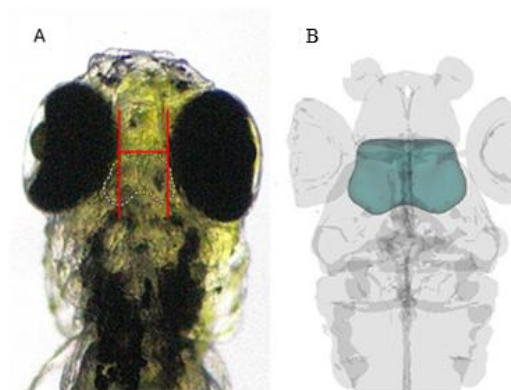


Figura 3: A) Larva de 5dpf en vista dorsal que indica como debe establecerse la medición del área del mesencéfalo y distancia interocular, Las líneas rojas indican el fin de las comisuras internas de cada globo ocular, desde y hasta donde se mide la distancia interocular. El punteo en blanco indica el área aproximada del mesencéfalo. B) Anatomía de la cabeza en vista dorsal de *Danio rerio*, indica la ubicación exacta del mesencéfalo. Extraídas de Kunst et al., (2019).

1.3 Evaluación de los efectos de la yesotoxina

Con el fin de evaluar los efectos de YTX sobre parámetros morfológicos en larvas de *Danio rerio*, se realizaron ensayos experimentales siguiendo la misma metodología descrita previamente. Grupos de 15 larvas de 5 días post-fertilización (dpf) fueron expuestas durante 24 horas a diferentes tratamientos: medio E3 (control negativo), etanol 1,2% (control positivo) y yesotoxina en las concentraciones de 0,38 $\mu\text{g/mL}$ y 0,04 $\mu\text{g/mL}$. Finalizado el periodo de exposición, las larvas fueron posicionadas en orientación dorsal sobre portaobjetos excavados y observadas bajo lupa estereoscópica a un aumento de 0,63X. Se obtuvieron imágenes de la región cefálica mediante una cámara digital acoplada al sistema óptico, las cuales fueron posteriormente analizadas utilizando el software ImageJ. En dichas imágenes se cuantificó la distancia interocular y el área del mesencéfalo, siguiendo los mismos criterios definidos en los experimentos anteriores.

Objetivo 2. Cuantificar la actividad locomotora de larvas de pez cebra expuestas a yesotoxina mediante ensayos de pulsos de luz-oscuridad.

2.1. Actividad locomotora

Las larvas de *Danio rerio* alcanzan un patrón de locomoción funcional, caracterizado por movimientos coordinados y dirigidos, aproximadamente entre los 4 y 5 días post-fertilización (dpf). Durante esta etapa, presentan sensibilidad a los cambios en las condiciones de iluminación, lo que permite evaluar tanto su actividad locomotora global como los patrones conductuales asociados a transiciones entre luz y oscuridad. En términos generales, se ha observado que la actividad locomotora larvaria tiende a incrementarse durante el paso de luz a oscuridad, probablemente como respuesta al estrés, y a disminuir cuando ocurre la transición inversa (Bastnet et al., 2019). Diversos estudios han demostrado que las alteraciones en este tipo de comportamiento locomotor pueden constituir indicadores sensibles de efectos neurotóxicos en el organismo (Chen et al., 2023; Pepe-Vargas et al., 2025).

De forma general, los estudios de neurotoxicidad que emplean larvas de *Danio rerio* presentan diferencias en aspectos metodológicos como el estadio larval seleccionado, el protocolo de exposición y el volumen o tipo de placas multipocillo utilizadas. La revisión de diversos autores sugiere que el uso de larvas entre 5 y 7 días posfecundación (dpf) en placas multipocillo de 24 pocillos constituye una condición experimental adecuada (Peng et al., 2016) (Yang et al., 2017). Para esta evaluación se utiliza el sistema wMicroTracker (Phylum Tech) el cual permite cuantificar la actividad locomotora de las larvas mediante la detección de interrupciones en haces de luz infrarroja que atraviesan cada pocillo en el que se encuentran alojadas. El equipo registra cada un min durante una hora, incluyendo los minutos de acondicionamiento (primeros 20 min) lo que permite obtener valores de actividad promedio versus el tiempo.

En esta investigación se empleó una placa de 24 pocillos con los distintos tratamientos experimentales: medio E3 como control negativo y ETOH 1,2% como control positivo, debido a que la literatura reporta que el etanol induce efectos neurotóxicos de manera dosis-dependiente (Howarth et al., 2011). Las concentraciones de toxina seleccionadas fueron 0,38 µg/mL, correspondiente al límite regulatorio, y 0,04 µg/mL. Adicionalmente, se incluyó un tratamiento denominado “Blanco” que consiste en una solución de medio E3 sin organismos vivos, con el objetivo cuantificar posibles interferencias en las mediciones, tales como vibraciones o impurezas propias del medio.

Para cada tratamiento se dispusieron 10 larvas en un volumen de 1000 µL de solvente, realizándose cada condición por triplicado. No obstante, únicamente los tratamientos control (E3 y ETOH 1,2%) fueron preparados en la placa de poliestireno. Esto se fundamenta en antecedentes bibliográficos que indican que las toxinas lipofílicas pueden adsorberse a este material (Costa et al., 2020). Entonces con el fin de evitar este fenómeno, los tratamientos que contenían toxina fueron preparados en viales de vidrio, en los cuales se introdujeron tanto las larvas como las concentraciones correspondientes. El experimento considero la exposición por un período de 24 horas.

Posterior a este tiempo la placa con las larvas se llevó al equipo wmicrotracker el cual fue mantenido sobre una almohadilla anti-vibraciones dentro de una incubadora con fotoperiodo controlado (VELP), a una temperatura de 28 °C, durante 24h, asegurando que los viales permanecieran parcialmente tapados con el fin de permitir una adecuada circulación del aire. El sistema WMicrotracker se mantuvo conectado a un computador donde fue posible ajustar las condiciones de registro como tiempo de exposición y duración de los pulsos de luz y oscuridad.

Objetivo 3. Cuantificar la expresión de ARNm de los genes ACHE, Caspasa 8 y mbp en larvas de pez cebra expuestas a yesotoxina.

Al terminar el ensayo de medición de actividad locomotora, las larvas fueron separadas en grupos de 15 larvas por tratamientos y transferidas a tubos eppendorf de 1,5ml. Se les agregó 100 µL de RNA Later y se dispusieron a -20°C para la posterior extracción de ARN.

3.1 Extracción de ARN, digestión con DNasa I y purificación.

La extracción se realizó según recomendaciones del fabricante E.Z.N.A.® Total RNA KIT I (Omega Bio-Tek). Se desinfectó el lugar de trabajo con etanol al 70%, se ubicaron los reactivos en un recipiente con hielo, incluyendo los tubos eppendorf de 1,5mL que contenían las larvas de *Danio rerio*. A estos tubos se les adicionó 700 µL de TRK Lysis Buffer y con un vástago se procedió a romper el tejido manualmente, también se añadieron 100 mg de Solid-glass beads de 1mm y se agitaron en vortex por 10 minutos. Los tubos eppendorf ya homogeneizados se centrifugaron a 17,000g por 5 min y el 500 µL del sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1,5mL; a este se le añadieron 500 µL de EtOH al 70% y se mezcló en el vortex durante 10 segundos. Posteriormente se insertaron mini columnas de ARN HiBind® en tubos de 2 mL y se les añadió 700 µL de la muestra, se centrifugó 1 min a 10.000 g descartando el filtrado, reutilizando el tubo colector y repitiendo este procedimiento hasta que toda la muestra se transfirió a la columna. Por otra parte, se preparó una solución stock de 75 µL de DNasa I (73,5 µL DNasa I Digestion Buffer + 1,5 µL DNasa I) mantenida a 4°C. Paso siguiente, a las mini columnas de ARN HiBind® se les añadieron 250 µL de RNA Wash Buffer I y fueron centrifugadas a 10.000g por un minuto, descartando el filtrado y reutilizando el tubo colector. Luego, se agregaron 75µL de la solución stock de DNasa I directamente en la membrana de las mini columnas las cuales fueron mantenidas a temperatura ambiente por 15 minutos. Se les adicionaron 250 µL de RNA Wash Buffer I, y se mantuvo a temperatura ambiente por dos minutos, se centrifugaron por 1 minuto a 10.000g, descartando el filtrado y reutilizando el tubo colector.

Luego de la digestión con DNasa se lavó dos veces con 500µL de RNA Wash Buffer II (diluido con EtOH 100%) y se centrifugó a 10.000g por un minuto, el tubo recolector es reutilizado y el filtrado descargado. Después las mini columnas de ARN vacías se centrifugaron a 17.000g por dos minutos para quitar todas las trazas de etanol que pudiese provocar interferencias. Las mini columnas se transfirieron a nuevos tubos eppendorf de 1,5mL y se les adicionó 40 µL de agua libre de nucleasas, para posteriormente ser centrifugadas dos minutos a 17.000g. Luego con la ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher) se determinó la concentración y analizó la pureza del ARN extraído. Se utilizó el criterio de aceptar aquellas muestras con valores entre 1,8 – 2,0 en la absorbancia 260/280 para la próxima síntesis de ADNc.

3.2 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó de acuerdo con las condiciones del fabricante AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies). El kit y los componentes necesarios fueron pasados por vortex y centrifugación. Para comenzar la síntesis en tubos de 0,5mL fueron agregados 2 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de master mix 2x, 3 µL de primer Oligo dT, 1 µL de enzima AffinityScript RT/ RNase Block y 4 µL de ARN. Las reacciones fueron incubadas en el termociclador en el siguiente orden: 25°C durante 5 min para permitir el alineamiento del primer. Luego, a 42°C por 15 min para la síntesis de ADNc. Finalmente, las reacciones fueron incubadas a 95°C durante 5 min. Luego con la ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher) se determinó la concentración y analizó la pureza del ADN extraído, para ello, se depositó 1µL de cada muestra directamente sobre el compartimiento para la muestra del equipo, previa calibración con agua libre de nucleasas como blanco. Se utilizó el criterio de aceptar aquellas muestras con valores entre 1,8 – 2,0 en la absorbancia 260/280.

3.3 qPCR en tiempo real

Para realizar la qPCR en tiempo real se utilizaron tiras de tubos eppendorf de 0,2 mL los que en su interior contenían 5 µL de Mix Sybr, 2 µL de primer forward, 2 µL de primer reverse y 1 µL de ADNc en concentración de 400ng/µL. Se adicionó un control negativo (blanco) que no contenía ADNc. El protocolo de amplificación fue el siguiente: 1Ciclo de 10 minutos a 95°, 40Ciclos de 15s a 95°, 15s a 60°, 45s a 72° y 1Ciclo de 30s a 95°, 30s a 60°, 30s a 95°. El cambio de expresión relativa de los genes utilizados Caspasa 8, Acetilcolinesterasa (ache) y Proteína básica de mielina (mbp) se analizaron por cuadruplicado en el equipo AriaMx Real-Time PCR G830A a través del método 2– $\Delta\Delta C_t$ (Livak et al. 2001). Se utilizaron como genes normalizadores el gen ribosomal 18S, β -actina, Elfa 1 y Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, luego, a través de una comparación de genes en Normfinder para ver cuál era el gen menos inestable, se eligió 18s y se normalizó a partir de la concentración más baja para realizar los cálculos.

Tabla 1: Secuencia de genes asociados en la evaluación de efectos neurotóxicos y genes normalizadores.

Nombre del gen	Secuencia	Genbank	Referencia
mbp	F: AATCAGCAGGTTCTTCGGAGGAGA R: AAGAAATGCACGACAGGGTTGACG	AY860977	Wu et al. (2016)
Caspasa 8	F: TGCTGATGTTTGTGGAGGAGATG R: GGTCTGCTTCTTGTTGATGTTGG	NM_131877	Krumschnabel et al. (2009)
Ache	F: CATACGCACAATACGCTGCC R: TACACAGCACCATGCGAGTT	NM_131846.2	Pullaguri et al. (2020)
β -actina	F: CAGCAAGCAGGAGTACGATGAGT R: TTGAATCTCATTGCTAGGCCATT	NM_131031.1	Sopezki et al. (2018).
18S	F: AGGGACAAGTGGCGTTCAGC R: GCAGGGTAGGCACACGTTGA	FJ915075.1	Sopezki et al. (2018)
G6PDH	F: CGCTGTTGACCTGGTTGTTG R: AGGATGACCTTGCCACAGT	XM_041012418.1	Sopezki et al. (2018).
EF1 α	F: CTTCTCAGGCTGACTGTGC R: CCGCTAGCATTACCCTCC	NM_131263.1	McCurley & Callard (2008)

Análisis estadístico

Los resultados de distancia interocular y el tamaño del mesencéfalo fueron expresados en mm. Para su análisis se aplicó además una prueba Anova de una vía para comparar las medias de los grupos y ver diferencias significativas entre ellas y una prueba Holm-Sidak test de múltiples comparaciones.

Los resultados de comportamiento locomotor se les realizó una prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para ver si los datos eran paramétricos o no y luego una prueba Anova en caso de ser paramétricos, en el caso de que no lo fuesen se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis además de una prueba de Dunn's de múltiples comparaciones.

A los resultados de expresión genética se les hizo una prueba de normalidad, verificando homogeneidad de varianza a todos los datos, un ANOVA para comparar las medias de los grupos y ver diferencias

significativas entre ellas y una prueba Holm-Sidak test de múltiples comparaciones. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism, LLC (versión 10.5.0).

RESULTADOS

El objetivo principal en este trabajo fue evaluar el impacto neurotóxico de la toxina lipofílica Yesotoxina en larvas de pez cebra a nivel morfológico, conductual y molecular.

Los resultados de los experimentos de definición de concentración de control positivo y reversibilidad del efecto mostraron que el promedio del área del mesencéfalo para aquellas larvas incubadas en la solución E3 fue de $1,30\text{mm}^2$, mientras que en etanol fue de $0,83\text{mm}^2$ en 1,2% y de $0,85\text{mm}^2$ en 1,5%; lo que indica una disminución significativa ($p < 0,05$) del tamaño de mesencéfalo en aquellas expuestas a etanol en comparación con el control (Figura 4 y 5A). En relación con la distancia interocular los resultados también mostraron una disminución significativa de este atributo en larvas expuestas a etanol (E3: $0,109\text{mm}$; EtOH 1,2%: $0,777\text{mm}$ y EtOH 1,5% $0,788\text{mm}$ (Figura 4 y 5B).

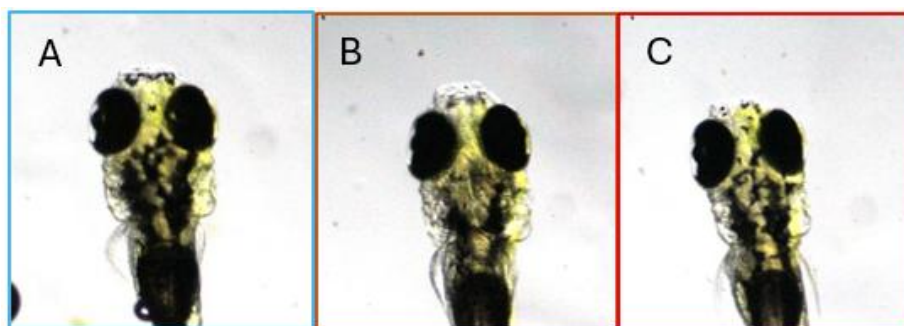


Figura 4. Larvas de *Danio rerio* en posición dorsal expuestas a los diferentes tratamientos. A) Larva en inmersión en medio E3. B) Larva expuesta durante 3 horas a una concentración de 1,2% de EtOH y luego traspasada a medio E3 por 24. C) Larva luego de ser expuestas por 3 horas a una concentración de 1,5% de EtOH y luego ser traspasada a medio E3 por 24 horas.

Estos resultados confirman que el EtOH induce cambios morfológicos en la distancia interocular como en el tamaño del mesencéfalo en larvas de pez cebra expuestas 24 hrs a EtOH, en ambas concentraciones (1,2% y 1,5%). Se definió que la concentración adecuada para control positivo fue de 1,2% (Figura 5). Por otra parte, el segundo experimento realizado con etanol indica que la exposición a etanol, el cual produce disminución en la distancia interocular y tamaño del área del mesencéfalo es irreversible, ya que se mantienen las diferencias significativas tanto en el área del mesencéfalo (Figura 6A) como en la distancia interocular (6B), respecto al control a las 24 horas postexposición.

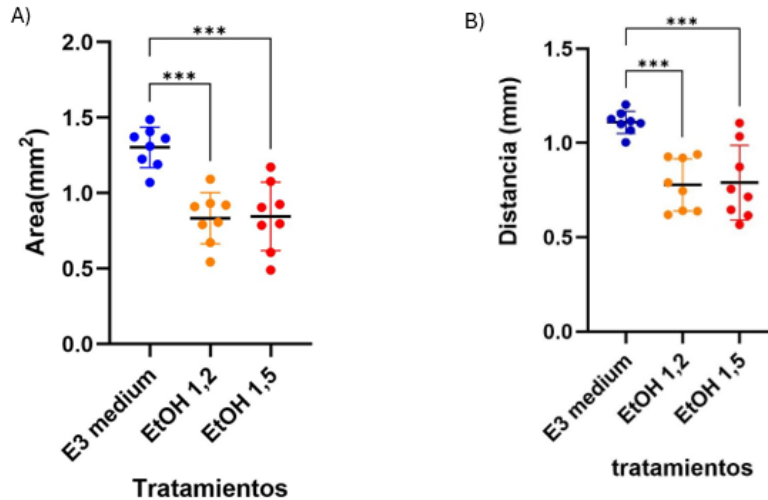


Figura 5: A) Área del mesencéfalo en milímetros de larvas de 6dpf expuestas a los tratamientos con E3 (control negativo), EtOH 1,2% y EtOH 1,5%. B) Distancia interocular en los mismos tratamientos. (***) $p < 0,001$). Las diferencias no significativas entre pares no son indicadas.

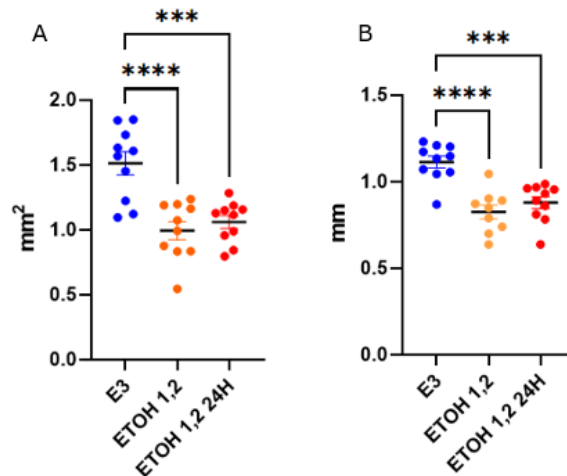


Figura 6: Larvas de 5dpf expuestas a los tratamientos de E3(control negativo), EtOH 1,2% (control positivo y EtOH 24H post exposición A) Área del mesencéfalo en mm². B) Distancia interocular en mm. (***) $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Distancia interocular y tamaño del área del mesencéfalo de larvas expuestas a YTX.

El primer experimento realizado con YTX evidenció una disminución de la distancia interocular y del área del mesencéfalo en larvas expuestas a la toxina y control positivo. Tanto el tamaño del mesencéfalo como la distancia interocular de las larvas de *Danio rerio* expuestas a YTX 0,38µg/mL fueron menores a las de larvas incubadas en medio E3, pero sin diferencias con aquellas incubadas en etanol (Figura 7). Las mayores diferencias se dieron en el área del mesencéfalo donde hubo diferencias entre todos los tratamientos (Figura 7A).

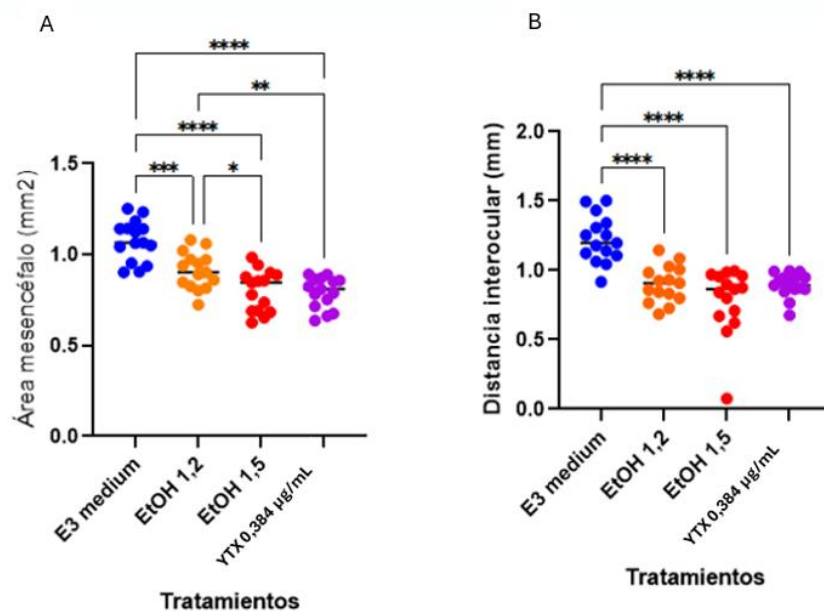


Figura 7. A) Área del mesencéfalo en mm² de larvas de *Danio rerio* de 5dpf expuestas a los diferentes tratamientos E3 (Control negativo), EtOH 1,2 y 1,5 (Controles positivos) y YTX 0,384µg/mL. B) Distancia interocular en mm de larvas de 5dpf expuestas a los distintos tratamientos (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).

El segundo experimento realizado con dos concentraciones de toxina indica una disminución significativa de la distancia interocular y del área del mesencéfalo en ambas concentraciones. En el área del mesencéfalo se observan diferencias significativas con respecto al medio E3 tanto en el grupo expuesto a 0,38µg/mL como 0,04µg/mL (Figura 8A); al igual que en la distancia interocular (Figura 8B). Este efecto es equivalente al inducido por el EtOH.

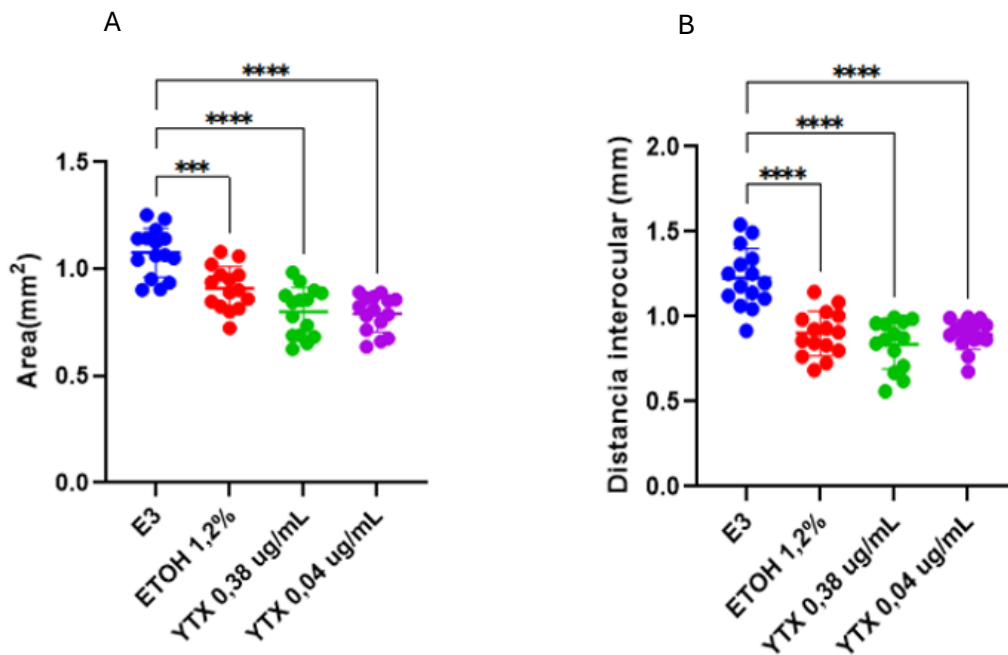


Figura 8. A) Área del mesencéfalo en mm² y B) Distancia interocular de 15 larvas de pez cebra expuestas a distintos tratamientos: E3 (control negativo), EtOH 1,2% (control positivo) y dos concentraciones de YTX. ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Actividad locomotora en larvas expuestas a YTX

Los resultados del experimento preliminar de actividad locomotora muestran que las larvas en los primeros 20 minutos de exposición a las YTX (acondicionamiento) presentan una disminución significativa en la actividad locomotora en comparación al control medio E3 (Figura 9A). Se observó que existieron diferencias significativas entre el control E3 y la YTX y también en relación con el etanol (Figura 9B).

Posteriormente al ser expuestas a ciclos alternados de luz y oscuridad (Figura 9C) se observa que en los minutos 30 a 40, si bien responden al estímulo de sobresalto en oscuridad, este rápidamente desciende en comparación del control que es sostenido y constante. Luego, dentro de los minutos 40 a 50 de luz las larvas expuestas a YTX mantienen un patrón similar al control E3, condición que se repite con el aumento de la actividad locomotora en los minutos 50 a 60 de oscuridad. En la figura 9D que muestra la actividad promedio en los bloques de luz y oscuridad donde sólo hubo diferencias significativas durante los primeros 10 minutos con luz, con una mayor actividad de las larvas expuestas a YTX.

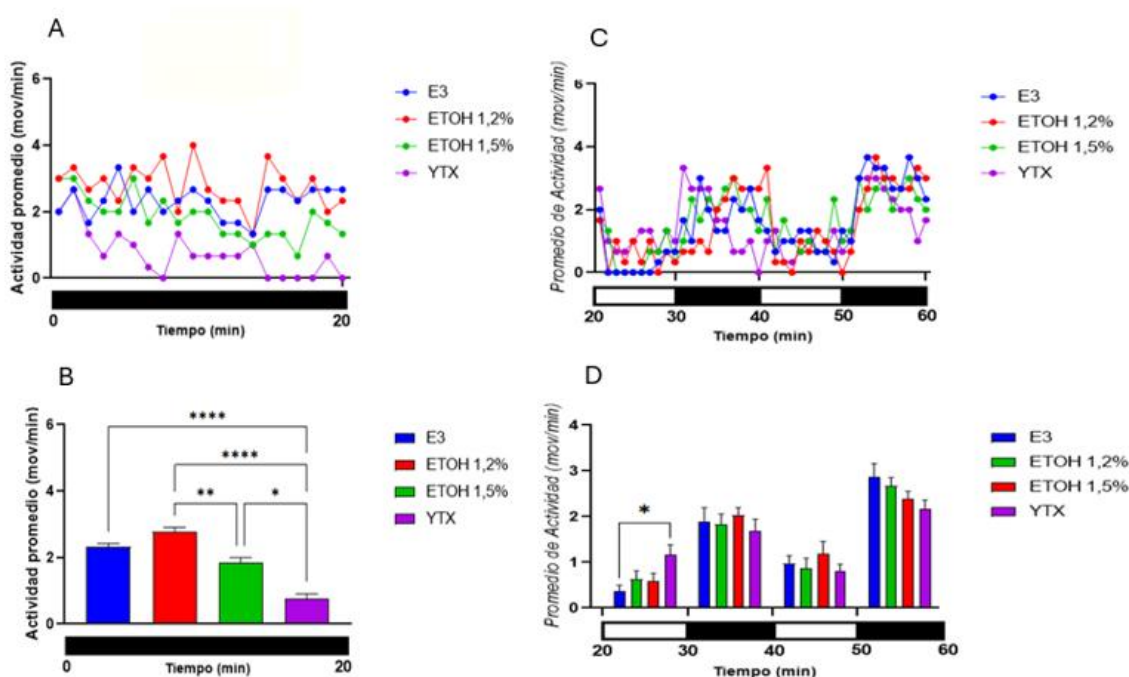


Figura 9. Actividad locomotora de larvas de 5dpf expuestas a medio E3 (control negativo), EtOH 1,2 y 1,5 (controles positivos) y YTX 0,38 μ g/mL. A). Periodo de acondicionamiento (20 min oscuridad) cada punto indica el promedio de movimientos de 10 larvas. B) Promedio de actividad en 20 minutos de actividad C) Actividad locomotora en bloques alternados de luz y oscuridad (en total 60min). D) Actividad locomotora promedio en bloques de 10 min de luz y oscuridad. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

En el segundo experimento que consideró dos concentraciones de toxina se observó que aquellas larvas expuestas a la concentración más alta de 0,38 μ g/mL YTX en los primeros veinte minutos de acondicionamiento presentan un patrón disminuido de la actividad locomotora en comparación al grupo control, pero no lo suficiente para ser significativo. Las larvas expuestas a la concentración más baja de 0,04 μ g/mL siguen un patrón similar a las que están suspendidas en E3; condición que se repite durante los siguientes 50 min de luz-oscuridad. Se observan diferencias significativas entre el tratamiento control y YTX 0,04 μ g/mL entre los minutos 30-40 y 50-60. También en los minutos 20-30 y 40-50 en los tratamientos con YTX 0,38 μ g/mL (Figura 10).

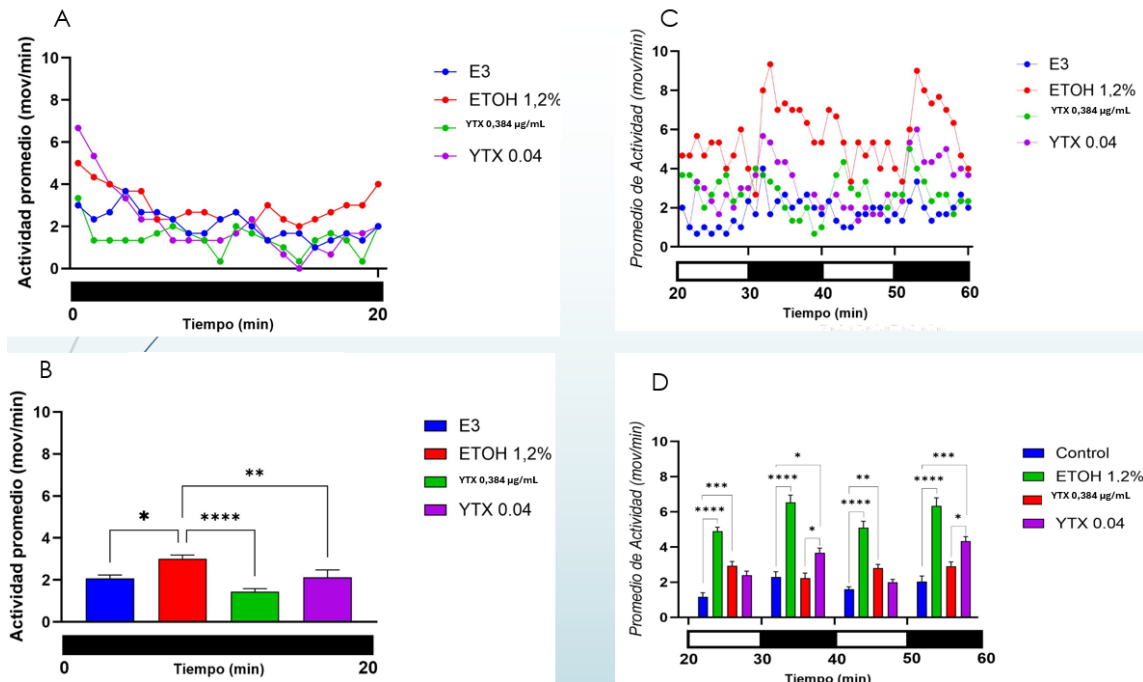


Figura 10. Actividad locomotora de larvas de 5dpf expuestas a medio E3 (control negativo), EtOH 1,2% (Control positivo) y YTX en concentraciones de 0,38µg/mL y 0,04 µg/mL. A) periodo de acondicionamiento (20 min oscuridad), cada punto indica el promedio de 10 larvas de movimientos B) actividad locomotora promedio de 20 min de actividad. C) Actividad locomotora promedio en bloques de tiempo alternados de luz/oscuridad (en total 60min). D) Actividad locomotora promedio de 10 min de luz y oscuridad. (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001)

Elección del gen para normalización y expresión de ARNm

El análisis de los valores de los ciclos de cuantificación (Cq) de los genes normalizadores reveló variaciones significativas entre los tratamientos, evidenciando una falta de estabilidad en su expresión, lo que compromete la validez de la normalización de los datos de expresión génica (Figura 11). Por ejemplo, el gen de referencia 18S presenta una diferencia de aproximadamente 7 unidades de Cq entre el control y el tratamiento, lo que indica una variabilidad considerable en su expresión. Como consecuencia, el efecto observado en el gen de interés se percibe más acentuado que en el gen de referencia, sugiriendo un mayor cambio relativo en su expresión; sin embargo, esta interpretación resulta poco confiable si la normalización se realiza con un gen de referencia inestable. Al evaluar un segundo gen de referencia, como la *β-actina*, se observa un comportamiento similar en los valores de Cq, lo que confirma que los genes de referencia no mantienen una expresión constante bajo las condiciones experimentales. Esto implica que los resultados obtenidos pueden estar influenciados tanto por cambios reales en la expresión del gen de interés como por la variabilidad en la expresión de los genes de referencia.

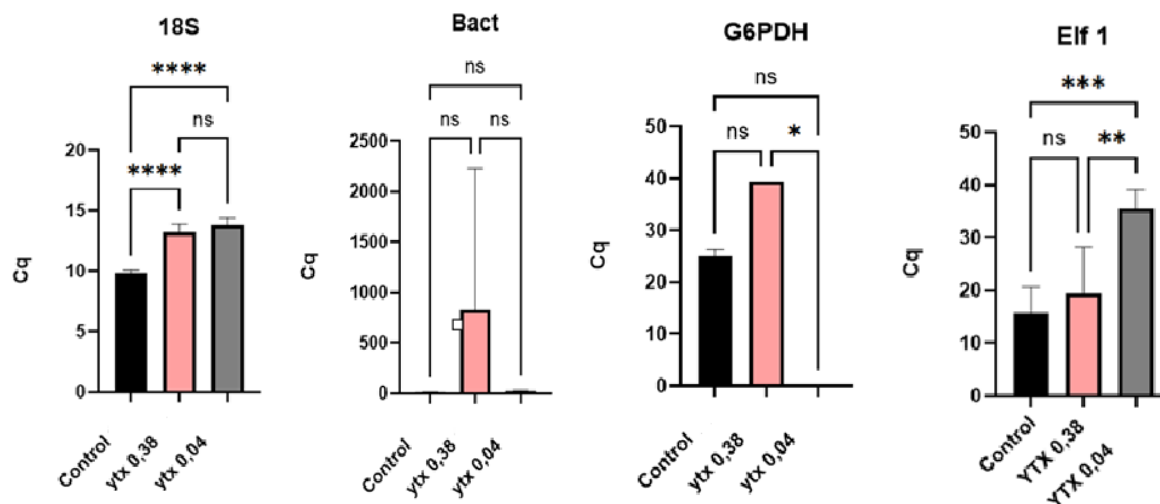


Figura 11: Ciclos de cuantificación (Cq) de los distintos tratamientos: Control E3 (control negativo), YTX 0,38 μ g/mL y 0,04 μ g/mL aplicados en los genes utilizados en el estudio: 18S, *beta actina*, *elf 1* y *g6pdh*. (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

En consecuencia, la expresión de ARNm de los genes *caspasa 8*, *mbp* y *ache* fue normalizada utilizando el gen 18S, el cual presentó la menor variabilidad relativa según los análisis efectuados mediante los algoritmos GeNorm, BestKeeper y NormFinder (Figura 12). El análisis de ranking comprensivo, basado en la media geométrica de los valores obtenidos por cada método, indica que el gen 18S presenta la mayor estabilidad de expresión (valor = 1.00), seguido por *alfa* (1.68), mientras que *bact* (3.00) y *g6pdh* (4.00) muestran menor estabilidad. Esto indica que el gen 18S es el gen de referencia más adecuado y a *g6pdh* como el menos estable bajo las condiciones evaluadas. Sobre la base de estos resultados se realizó el gen 18S como referencia, pese a su inestabilidad en este contexto experimental, con el fin de evidenciar los efectos derivados de una selección inadecuada de genes de referencia sobre la interpretación de los resultados de expresión génica (Figura 13).

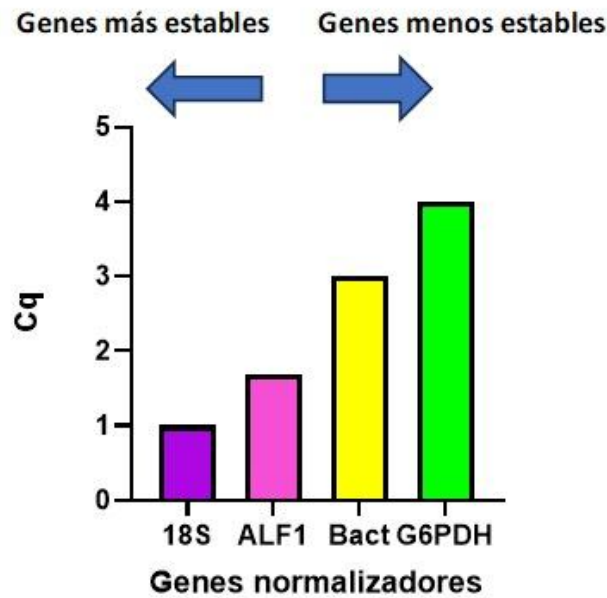


Figura 12: Evaluación de la estabilidad de genes de normalización mediante un ranking integral. Se compararon cuatro genes candidatos (*18S*, *alf*, *Bactina* y *G6pdh*) utilizando diferentes algoritmos de normalización (Delta CT, BestKeeper, NormFinder y GeNorm).

La evaluación de la expresión de *ache* mostró que no hubo diferencias significativas en su expresión en larvas expuestas a ambas concentraciones de YTX y el control (Figura 13A). En relación con la expresión de la proteína básica de mielina, aquellas larvas que fueron tratadas con 0,04µg/mL presenta un aumento significativo en comparación a aquellas tratadas con 0,38µg/mL. La concentración de 0,04µg/mL muestra diferencias significativas con EtOH, pero el control *18S* sólo muestra dos diferencias significativas en relación con el control positivo EtOH (Figura 13B). Finalmente, en la expresión de *caspasa 8* sí vemos un aumento de la expresión de YTX al 0,04µg/mL con diferencias significativas respecto al grupo control y entre ambas concentraciones, 0,38µg/mL y 0,04µg/mL también se observa un aumento de la expresión con una alta significancia, respectivamente (Figura 11C).

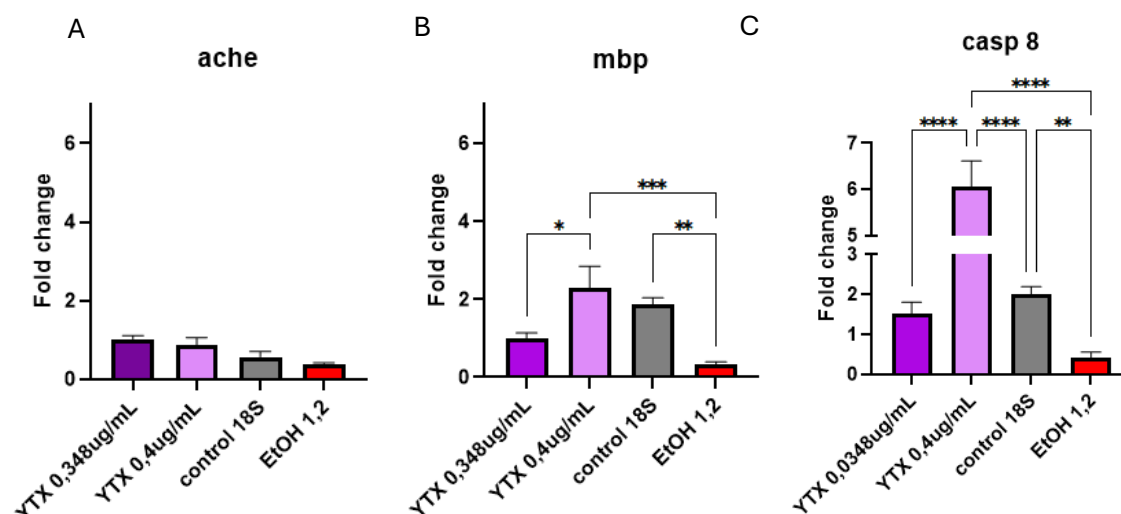


Figura 13. Expresión de ARNm de genes de *ache* y *mbp* y *caspasa 8* medidos mediante qPCR en tiempo real en larvas de pez cebra después de la exposición a concentraciones de medio E3 1x, YTX (0,38µg/mL y 0,04 ng/mL) y EtOH 1,2% durante 24h. Los datos se expresan como el promedio (+1 d.e.) de 4 réplicas. (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

DISCUSIÓN

La YTX es una biotoxina que históricamente ha recibido menor atención en revisiones científicas (Paz, 2008; Franchini, 2010), principalmente debido a la ausencia de reportes de intoxicación en humanos. Hasta la fecha, su mecanismo de acción molecular no ha sido completamente dilucidado; sin embargo, un estudio reciente ha evidenciado efectos adversos sobre el sistema cardiovascular en peces (Roa, 2025). Asimismo, en cultivos celulares se ha observado citotoxicidad asociada a alteraciones en los niveles de proteínas y de segundos mensajeros potencialmente involucrados en su mecanismo de acción, tales como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el calcio, las fosfodiesterasas (PDE), las proteincinasas C (PKC) y las proteínas de anclaje de A-quinasa, además de organelos celulares como las mitocondrias y el retículo endoplásmico. No obstante, estos efectos parecen depender del tipo celular, ya que se han reportado respuestas contradictorias entre diferentes líneas celulares (Franchini, 2010)

En este contexto, y considerando la limitada evidencia disponible en organismos *in vivo*, en el presente trabajo se evaluó el efecto neurotóxico de la yesotoxina en larvas de *Danio rerio* (pez cebra) de 5 días post fecundación expuestas vía inmersión. Para ello, se utilizaron dos concentraciones: una correspondiente al límite regulatorio actual (0,38 µg/mL) y otra 10 veces menor (0,04 µg/mL). Los resultados obtenidos indican que yesotoxina provoca neurotoxicidad en pez cebra afectando su comportamiento, desarrollo cerebral y expresión génica incluso a bajas concentraciones.

La utilización de este organismo resulta relevante en el contexto de la toxicología experimental, ya que, si bien los ensayos *in vitro* se caracterizan por ser métodos económicos, rápidos y relativamente sencillos de implementar, las células cultivadas presentan una correlación limitada con los mecanismos biológicos que ocurren *in vivo*, lo que restringe el valor traslacional de los resultados obtenidos. En este sentido, se ha propuesto al pez cebra como un modelo intermedio prometedor entre los estudios *in vitro* y los ensayos en organismos vertebrados más complejos, permitiendo evaluar respuestas biológicas integradas en un organismo completo (D'Amora, 2018). En concordancia con lo anterior, el uso de larvas de *Danio rerio* en el presente trabajo permitió aproximarse a los posibles efectos neurotóxicos de la yesotoxina en un sistema *in vivo*, contribuyendo a ampliar la información disponible sobre los efectos neurotóxicos de esta toxina.

El principal órgano diana después de la administración oral aguda o repetida de YTX, es el tejido cardíaco en ratones (Tubaro, 2003), pero también hay evidencia de la YTX en células neuronales de ratas, las que son objetivos biológicos vulnerables. La muerte de las ratas durante los experimentos fue precedida por síntomas que incluyeron descoordinación motora y saltos (Wolf, 1996). Algo similar se evidenció en este estudio en el cual al exponer a las larvas a la toxina se observó que luego de 20 minutos de exposición ocurrió una disminución de la actividad locomotora en comparación al control.

Por otra parte, en la exposición a ciclos de luz y oscuridad se observaron variaciones en la actividad locomotora en ambas concentraciones de yesotoxina, destacando una hiperactividad en 0,04 µg/mL durante

la fase de oscuridad, asociada a respuestas de sobresalto en comparación con el control. Este resultado concuerda con lo reportado por De la Paz (2022), quien describe un aumento de la actividad locomotora al inicio del periodo de oscuridad en larvas expuestas a YTX, sugiriendo una alteración del sistema neuromotor. En conjunto, estos hallazgos indican que incluso concentraciones inferiores al límite regulatorio pueden inducir efectos neurotóxicos a nivel conductual.

En concordancia con lo reportado por Su et al. (2025), los resultados obtenidos indican que caracteres morfológicos como la distancia interocular y el tamaño del mesencéfalo; los cuales pueden evaluarse fácilmente, permiten registrar alteraciones de manera rápida y con menor demanda de recursos. Gupta et al. (2018) indican que variaciones en la distancia interocular pueden reflejar alteraciones en el desarrollo neurológico y en la morfogénesis craneal, lo que respalda su uso como biomarcador sensible para la detección temprana de efectos neurotóxicos. Coincidentemente se ha mostrado que las alteraciones en el desarrollo neurológico también pueden repercutir en la morfología ocular y craneal. Por ejemplo, se ha observado que el daño neurológico inducido por hiperbilirrubinemia en larvas de *Danio rerio* provoca cambios en el tamaño ocular y en las estructuras cerebrales, lo que puede modificar la distancia interocular durante el desarrollo (Guzelkaya, 2023). Los resultados del presente estudio muestran que la exposición a Yesotoxina produjo alteraciones como las descritos en los estudios previos ya mencionados.

Por otra parte, Franchini (2004), en experimentos realizados en ratones suizos CDI expuestos a YTX, no reportó cambios morfofuncionales significativos en la corteza cerebral; sin embargo, sí describió daño en las células de Purkinje del cerebelo y alteraciones a nivel citoplasmático. En conjunto, estos antecedentes sugieren que los efectos neurotóxicos de la yesotoxina podrían manifestarse de manera diferencial según la región del sistema nervioso evaluada y el modelo experimental utilizado, pudiéndose evidenciar tanto a nivel morfológico como celular.

Para medir los cambios en la expresión genética asociados con el desarrollo y la fisiología normales, la disrupción endocrina, la toxicología y el descubrimiento de fármacos, los investigadores del pez cebra aplican cada vez más la PCR cuantitativa de transcripción inversa en tiempo real (qPCR) (Huggett, 2005). La qPCR presenta múltiples ventajas, entre ellas rapidez en la obtención de resultados, alta sensibilidad, reproducibilidad, capacidad de análisis a gran escala y cuantificación precisa (Nigard, 2007). No obstante, su uso presenta ciertas limitaciones, como la variabilidad inherente del ARN, la presencia de impurezas durante su extracción y las diferencias en la eficiencia de la transcripción inversa y de la PCR (Bustin, 2000). Por ello, es fundamental aplicar métodos de normalización adecuados que permitan controlar estas fuentes de error.

En este estudio se evidenció un impacto significativo de los tratamientos tóxicos sobre la expresión de los genes utilizados frecuentemente como referencia, lo que dificultó la correcta estimación de la expresión relativa de los genes de interés. Este fenómeno ocurre cuando los compuestos evaluados alteran de manera

sustancial la dinámica transcripcional celular (McCurley, 2008). En este contexto, es fundamental analizar las diferencias en los valores de Cq entre las distintas condiciones experimentales, las cuales, idealmente, deberían mantenerse constantes para los genes de referencia (Bustin, 2000). Esta estabilidad es un requisito clave para una adecuada normalización de los datos. En consecuencia, si el gen de referencia presenta una expresión invariable, el proceso de normalización no debería introducir variaciones en la expresión del gen de interés, permitiendo así una interpretación confiable de los resultados.

Los genes normalizadores o también llamados de mantenimiento celular (housekeeping, HK) se expresan de manera constitutiva para sostener las funciones básicas de la célula, generando los transcritos esenciales requeridos para su fisiología normal. Un gen HK “ideal” se caracteriza por presentar expresión amplia, estable y en niveles elevados, siendo estos atributos independientes entre sí, pero deseables para su definición (Casadei, 2011). Existe evidencia de que los genes housekeeping, como *β -actina* y *G6PDH*, pueden variar en su expresión dependiendo de las condiciones experimentales, procesos de proliferación y diferenciación, así como durante el desarrollo y entre distintos tejidos (Glare et al., 2002; Lin & Redies, 2012; Uddin et al., 2011). Por lo anterior, se ha sugerido la utilización de un conjunto de genes de referencia para la normalización, los cuales deben ser previamente validados para cada tipo de experimento (Vandesompele et al., 2002). En este estudio, los genes *18S*, *β -actina* y *G6PDH*, evaluados como candidatos a normalizadores, mostraron diferencias en sus niveles de expresión, evidenciando que no todos presentan una estabilidad constante bajo las condiciones estudiadas. De acuerdo con los análisis realizados mediante los algoritmos geNorm y NormFinder, el gen *18S* fue identificado como el más estable, mientras que *β -actina* y *G6PDH* presentaron una mayor variabilidad en su expresión.

A nivel morfológico, las alteraciones observadas tras la exposición a yesotoxina podrían estar relacionadas con modificaciones en la organización o estabilidad del citoesqueleto celular, considerando su importancia en la morfogénesis y el desarrollo de las estructuras neurales. En este contexto, la disminución de la distancia interocular y del área del mesencéfalo podría reflejar alteraciones en procesos celulares dependientes de la dinámica del citoesqueleto durante el neurodesarrollo. Sin embargo, esta asociación requiere ser confirmada mediante análisis específicos de componentes citoesqueléticos.

Estos resultados sugieren que el uso individual de estos genes como referencia podría introducir sesgos en la cuantificación de la expresión génica. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la importancia de seleccionar y validar cuidadosamente los genes de referencia, así como de considerar el uso de múltiples genes para lograr una normalización más robusta y confiable.

El gen del ARNr *18S* se ha considerado un control de referencia ideal para el análisis de qRT-PCR, ya que el nivel de ARNr parece variar considerablemente menos que la expresión de ARNm (Bustin 2000). Sin embargo, la yesotoxina tiene un efecto a nivel casi de transcripción de genes ribosomales. Uptain (1997) describe la respuesta al estrés ribotóxico como un daño dentro de un bucle conservado (el bucle alfa-sarcina) del ARN ribosómico *28S* (ARNr *28S*), que conduce a la inhibición o inhibición parcial de la síntesis de

proteínas, la activación transcripcional de los genes de respuesta temprana inmediata *c-jun* y *c-fos* y la activación de quinasas de estrés. La respuesta al estrés ribotóxico incluye procesos como la escisión del ARNr 28S, la inhibición de la síntesis proteica, la activación de MAPK y PKR, la inducción de genes de respuesta temprana (*c-fos* y *c-jun*) y la apoptosis (Iordanov et al., 1997); en este contexto, la YTX genera respuestas diferenciales según el tipo celular, inhibiendo la síntesis proteica en células L6 y activando MAP quinasas en ambos modelos de manera independiente, lo que sugiere que su acción depende de la funcionalidad ribosomal, a diferencia de otras ribotoxinas (Iordanov et al., 1997). También se evidencia que YTX es capaz de inducir la fosforilación de la MAP quinasa p38, así como la activación de c-jun y PKR, además de inhibir la síntesis de proteínas y provocar la escisión del ARNr 28S. Esta secuencia de eventos es comparable a la descrita para ribotoxinas como la anisomicina (He et al., 2012). En este contexto, YTX podría comportarse como una ribotoxina, activando vías de señalización conservadas similares a las inducidas por estos agentes, incluso antes de la escisión del ARNr. No obstante, aún no se ha determinado si YTX comparte sitios de unión en el ARNr con la anisomicina y el DON, lo que requiere mayor investigación (Suarez, 2014).

CONCLUSIONES

1. La exposición a yesotoxina (YTX) induce efectos neurotóxicos en larvas de *Danio rerio*, evidenciados a nivel morfológico y conductual.
2. A nivel morfológico, la exposición a yesotoxina produjo una disminución significativa de la distancia interocular y del área del mesencéfalo en larvas de *Danio rerio*, evidenciando alteraciones en el desarrollo neurológico. Estos efectos se observaron incluso a una concentración inferior al límite regulatorio, lo que sugiere que estos parámetros constituyen indicadores morfológicos sensibles para detectar alteraciones neurotóxicas inducidas por YTX durante el desarrollo larval.
3. A nivel conductual, la YTX provoca alteraciones en el comportamiento locomotor, caracterizadas por una disminución inicial de la actividad y respuestas alteradas frente a estímulos de luz-oscuridad, lo que indica disfunción del sistema neuromotor.
4. La inestabilidad de los genes de referencia, especialmente 18S, demuestra que la YTX afecta la regulación transcripcional global, comprometiendo la confiabilidad de la normalización en análisis de qPCR.
5. El modelo de larvas de *Danio rerio* se confirma como una herramienta sensible y adecuada para la evaluación de neurotoxicidad de toxinas marinas, permitiendo detectar efectos integrados en distintos niveles biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aballay-González, A., Gallardo-Rodríguez, J. J., Silva-Higuera, M., Rivera, A., Ulloa, V., Delgado-Rivera, L., Rivera-Belmar, A., & Astuya, A. (2020). Neuro-2a cell-based assay for toxicity equivalency factor: Proposal and evaluation in Chilean contaminated shellfish samples. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(1), 162–173. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1676919>
- Álvarez, G., Rengel, J., Álvarez, F., Pino, R., Muñoz, P., Rosales, S., Hevia, V., Araya, M., Díaz, P. A., Rivera, A., et al. (2020). Massive mortality of marine invertebrates associated with the presence of yessotoxins in northern Chile. *Harmful Algae News*, 64, 6–7.
- Álvarez, G., Uribe, E., Díaz, R., Braun, M., Mariño, C., & Blanco, J. (2011). Bloom of the yessotoxin-producing dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in northern Chile. *Journal of Marine Research*, 65, 427–434.
- Band-Schmidt, C. J., & Rodríguez-Gómez, C. F. (Eds.). (2022). *Proceedings of the 19th International Conference on Harmful Algae*. International Society for the Study of Harmful Algal Blooms.
- Basnet, R. M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., & Memo, M. (2019). Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. *Biomedicines*, 7(1), 23. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023>
- Berry, J. P., Gantar, M., Gibbs, P. D., & Schmale, M. C. (2007). The zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 145(1), 61–72.
- Bianchi, C., Fato, R., Angelin, A., Trombetti, F., Ventrella, V., Borgatti, A. R., Fattorusso, E., Ciminiello, P., Bernardi, P., Lenaz, G., & Castelli, G. P. (2004). Yessotoxin, a shellfish biotoxin, is a potent inducer of permeability transition in isolated mitochondria and intact cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1656(2–3), 139–147.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169–193.
- Casadei, R., Pelleri, M. C., Vitale, L., Facchin, F., Lenzi, L., Canaider, S., et al. (2011). Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 11(3–4), 271–276.
- Centro de Ciencia del Clima y la Resiliencia (CR2). (2023). *Red tide and global change report (2nd ed.)*.
- Chen, S., Qin, Y., Ye, X., Liu, J., Yan, X., Zhou, L., et al. (2023). Neurotoxicity of Cu(OH)₂ nanopesticide through perturbing multiple neurotransmitter pathways in developing zebrafish. *Environmental Science & Technology*, 57(48), 19407–19418.
- Costa, S. T., Rudnitskaya, A., Vale, C., Guilhermino, L., & Botelho, M. J. (2020). Sorption of okadaic acid onto plastics in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 157, 111322.
- D’Amora, M., & Giordani, S. (2018). The utility of zebrafish as a model for screening developmental neurotoxicity. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 976.

- De la Paz, J. F., Zambrano, N. O., Yañez, P., Anguita-Salinas, C., Miranda, M., Astuya-Villalón, A., Allende, M. L., & Llanos-Rivera, A. (2022). Negative impacts of lipophilic toxins on zebrafish development, immune system, and tissue regeneration. In C. J. Band-Schmidt & C. F. Rodríguez-Gómez (Eds.), *Proceedings of the 19th International Conference on Harmful Algae, La Paz, B.C.S., Mexico* (pp. 187–188). International Society for the Study of Harmful Algal Blooms.
- Díaz, P. A., Araya, M., Cantarero, B., Miranda, C., Varela, D., Figueroa, R. I., et al. (2024). Are yessotoxins an emerging problem in Chile? *Environmental Pollution*, 361, 124844.
- Dillon, M., Dorta, B., & Arévalo, F. (2021). Development of methods for detecting marine toxins: Advances and challenges. *Journal of Marine Research*, 10(2), 45–58.
- FAO. (2005). *Marine biotoxins*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Franchini, A., Marchesini, E., Poletti, R., & Ottaviani, E. (2004). Acute toxic effect of yessotoxin on Purkinje cells. *Toxicon*, 43(3), 347–352.
- Franchini, A., Malagoli, D., & Ottaviani, E. (2010). Targets and Effects of Yessotoxin, Okadaic Acid and Palytoxin: A Differential Review. *Marine Drugs*, 8(4), 1301–1324. <https://doi.org/10.3390/md8041301>
- Freshney, I. (2015). *Culture of animal cells* (7th ed.). Wiley.
- Glare, E. M., Divjak, M., Bailey, M. J., & Walters, E. H. (2002). β -actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*, 57(9), 765–770.
- Glibert, P. M., Anderson, D. M., Gentien, P., Granéli, E., & Sellner, K. G. (2005). The global, complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography*, 18(2), 136–147.
- Gupta, T., Marquart, GD, Horstick, EJ, Tabor, KM, Pajevic, S., & Burgess, HA (2018). Análisis morfológico y mapeo neuroanatómico del cerebro del pez cebra. *Methods*, 150, 49–62.
- Guzelkaya, M., Onal, E., Gelinci, E., Kumral, A., & Cakan-Akdogan, G. (2023). A zebrafish model for studying the mechanisms of newborn hyperbilirubinemia and bilirubin-induced neurological damage. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1275414.
- He, K., Zhou, H. R., & Pestka, J. J. (2012). Targets and intracellular signaling mechanisms for deoxynivalenol-induced ribosomal RNA cleavage. *Toxicological Sciences*, 127(2), 382–390.
- Howarth, D. L., Passeri, M., & Sadler, K. C. (2011). Drinks like a fish: Using zebrafish to understand alcoholic liver disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(5), 826–829.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time qPCR normalisation: Strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6, 279–284.
- Iordanov, M. S., Pribnow, D., Magun, J. L., et al. (1997). Ribotoxic stress response. *Molecular and Cellular Biology*, 17(6), 3373–3381.
- Korsnes, M. S., Røed, S. S., Tranulis, M. A., Espenes, A., & Christophersen, B. (2014). Yessotoxin triggers ribotoxic stress. *Toxicology in Vitro*, 28(5), 975–981.

- Krock, B., Seguel, C., Valderrama, K., & Tillmann, U. (2009). Pectenotoxins and yessotoxins in northern Chile. *Toxicon*, 54, 364–367.
- Kunst, M., Laurell, E., Mokayes, N., Kramer, A., Kubo, F., Fernandes, A. M., et al. (2019). A cellular-resolution atlas of the larval zebrafish brain. *Neuron*, 103(1), 21–38.
- Legradi, J., et al. (2018). Neurotoxicity screening in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 67, 102–112.
- Lin, J., & Redies, C. (2012). Histological evidence: Housekeeping genes β -actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Development Genes and Evolution*, 222(6), 369–376.
- Morales, R. A., & Allende, M. L. (2019). Peripheral macrophages promote tissue regeneration in zebrafish by fine-tuning the inflammatory response. *Frontiers in immunology*, 10, 253.
- Orsi, C. F., Colombari, B., Callegari, F., & Todaro, A. M. (2010). Yessotoxin inhibits phagocytic activity of macrophages. *Toxicon*, 55(2–3), 265–273.
- Pang, M., Qu, P., Gao, C. L., Wang, Z. L., Jiang, N., & Gao, Y. H. (2012). Yessotoxin induces apoptosis in human liver cells. *Molecular Medicine Reports*, 5(1), 211–216.
- Paz, B., Daranas, A. H., Norte, M., Riobó, P., Franco, J. M., & Fernández, J. J. (2008). *Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: An overview*. *Marine Drugs*, 6(2), 73–102. <https://doi.org/10.3390/md20080005>
- Pepe-Vargas, P., Yañez-Bailey, P., Zambrano, N., de la Paz, J., Cruzat, F., Krock, B., & Llanos-Rivera, A. (2025). Immersion exposure to okadaic acid triggers neurotoxic and hepatotoxic responses in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Marine Environmental Research*, 107412.
- Peng, X., Lin, J., Zhu, Y., et al. (2016). Behavioral responses of zebrafish larvae. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 145, 55–65.
- Pullaguri, N., et al. (2021). Triclosan affects motor function in zebrafish. *Chemosphere*, 266, 128930.
- Regnault, B., et al. (2016). Neurotoxicity assessment using zebrafish. *Toxicological Sciences*, 149(1), 10–19.
- Roa, S. (2025). *Cardiovascular alterations in zebrafish exposed to yessotoxin*. Universidad de Concepción.
- Rodríguez-Villegas, C., Lee, M. R., Salgado, P., Figueroa, R. I., Baldrich, Á., Pérez-Santos, I., ... & Díaz, P. A. (2021). Drivers of dinoflagellate benthic cyst assemblages in the NW Patagonian Fjords System and its adjacent oceanic shelf, with a focus on harmful species. *Science of The Total Environment*, 785, 147378.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. (2024). *Manual de inocuidad y certificación: Control de exportación y certificación*. [Sernapesca](https://www.sernapesca.cl/manuales_y_publicaciones/manual-de-inocuidad-y-certificacion/). https://www.sernapesca.cl/manuales_y_publicaciones/manual-de-inocuidad-y-certificacion/ [1]
- Sipes, N. S., et al. (2011). Molecular approaches in zebrafish neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(1), 62–72.
- Sopezki, M. D. S., Monserrat, J. M., Yunes, J. S., & Zanette, J. (2018). Validation of housekeeping genes in zebrafish. *Zebrafish*, 15(5), 454–459.

- Su, M., Zhuo, J., & Li, L. (2025). An accurate and sensitive method for neurotoxicity assessment of emerging contaminants in zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 300, 118438.
- Thellin, O., et al. (1999). Housekeeping genes as internal standards. *Journal of Biotechnology*, 75, 291–295.
- Tubaro, A.; Sosa, S.; Carbonatto, M.; Altinier, G.; Vita, F.; Melato, M.; Satake, M.; Yasumoto, T. Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon* 2003, 41, 783–792.
- Uddin, M. J., et al. (2011). *Reference genes for gene expression studies in human tissues*. BMC Research Notes, 4, 441.
- Uptain, S. M., Kane, C. M., & Chamberlin, M. J. (1997). Transcript elongation mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 117–172.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biology*, 3(7), research0034.1–research0034.11. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- Vivanco Font, E. (2022). *Presencia de marea roja en Chile: Conceptos e impactos*. [Biblioteca del Congreso Nacional de Chile \(BCN\)](#). [1]
- Wolf, L. W., LaRegina, M. C., & Tolbert, D. L. (1996). Cerebellar ataxia study. *Behavioural Brain Research*, 75, 67–81.
- Wu, Q., Yan, W., Liu, C., et al. (2016). Microcystin-LR neurotoxicity in zebrafish.
- Yang, X., Lin, J., Peng, X., et al. (2017). Effects of picrotoxin in zebrafish larvae. *Epilepsy & Behavior*, 70, 224–231.