



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS



**EFFECTO DE LA TOXINA LIPOFÍLICA PECTENOTOXINA EN EL
DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVAL TEMPRANO DEL PEZ CEBRA
*DANIO RERIO***

POR

LOURDES DEL ROCIO SALINAS FIGUEROA

Profesora guía: Dra. Alejandra Llanos Rivera

Seminario de título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar el título de
BIÓLOGA MARINA

Concepción – Chile

Septiembre - 2024

Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Este seminario de título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas en el Laboratorio de Toxicología Acuática.

Profesor(a) Guía

Dra Alejandra Llanos Rivera
Departamento de
Oceanografía
Facultad de Ciencias Naturales
y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Ha sido aprobada por la
siguiente Comisión
Evaluadora:

Dra Allison Astuya Villalón
Departamento de
Oceanografía
Facultad de Ciencias
Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr Leonardo Castro Cifuentes
Departamento de
Oceanografía
Facultad de Ciencias
Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Jefe de Carrera

Dr Ariel Valenzuela
Departamento de
Oceanografía
Facultad de Ciencias
Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al Laboratorio de toxicología acuática de la Universidad de Concepción, lugar en donde logré realizar esta tesis y el cual sus integrantes me ayudaron a realizar mis experimentos. En especial me gustaría agradecer a mi profesora guía, Alejandra Llanos por abrirme las puertas de su laboratorio y tenerme infinita paciencia en este proceso.

Junto a ello me gustaría agradecer a mi familia, especialmente a mi mamá, por cada día motivarme a seguir, a Gabriel, por no dejar que me rinda y brindarme infinito amor y apoyo en este proceso, a mis amigos, que me han acompañado durante este tiempo y a todas las personas que de alguna u otra forma han apoyado en la elaboración de esta tesis.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	13
1. Obtención de embriones.....	13
2. Prevención adsorción toxinas.....	14
3. Concentraciones de los tratamientos.....	14
4. Preparación estándar PTX y soluciones.....	15
5. Controles.....	15
6. Diseño experimental ensayo desarrollo embrionario y actividad locomotora.....	16
7. Diseño experimental ensayo desarrollo larval	17
8. Evaluación actividad locomotora	18
9. Diseño experimental neurotoxicidad mediante ensayo enrollamiento de cola en embriones de pez cebra.....	18
10. Diseño experimental neurotoxicidad mediante ensayo de medición de actividad locomotora	19
11. Análisis estadístico.....	20
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

INDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Esquema procedimiento de obtención de ovas y posterior selección bajo lupa.....	13
Figura N°2. Ilustración de las etapas que incluye el desarrollo embrionario utilizado para el ensayo.....	16
Figura N°3:Fotografía detalle de las mediciones realizadas.....	17
Figura N°4. Ilustración que indica las etapas que abarca el estudio del desarrollo larval.....	18
Figura N°5: Actividad de enrollamiento de la cola en embriones de pez cebra.....	19
Figura N°6: Estandarización control positivo.....	21
Figura N°7: Porcentaje supervivencia primer ensayo a las 24h post exposición.....	22
Figura N°8: Resultados segundo ensayo embrionario	23
Figura N°9: Longitud total, área de saco vitelino, diámetro de ojo y capsula ótica en larvas recién eclosionadas expuestas por 96h a los distintos tratamientos.....	25
Figura N°10: Porcentaje de (a) supervivencia a las 48h y (b) eclosión a las 72h.....	25
Figura N°11: Evaluación longitud total, área de saco vitelino, ojo y capsula ótica ensayo desarrollo embrionario.....	27
Figura N°12: Evaluación longitud total, ojo y capsula ótica ensayo desarrollo embrionario.....	28
Figura N°13: Promedio de actividad de embriones expuestos a medio E3, 3 mg/L 3,4 DCA, 3,2 ug/L PTX y su respectivo control solvente (0,00452%DMSO luego de 24h de exposición.....	29
Figura N°14: Promedio de actividad de larvas expuestas a medio E3, 0,80 ug/L, 1,6 ug/L y 3,2 ug/L de PTX luego de 48h de exposición.....	29
Figura N°15: a) Ciclo de actividad promedio en embriones de <i>Danio rerio</i> . b) Promedio de actividad de embriones de <i>Danio rerio</i> expuestas a Medio E3 (control negativo), 3mg/L 3,4 DCA, 0,80 ug/L, 1,6 ug/L 3,2 ug/L PTX, durante 80 minutos.....	31
Figura N°16: Promedio de actividad locomotora de larvas de <i>Danio rerio</i> expuestas a medio E3 (control negativo), 3mg/L 3,4 DCA, 0,80 ug/L, 1,6 ug/L 3,2 ug/L PTX, durante 80 minutos.....	32

Resumen

Las pectenotoxinas (PTXs), biotoxinas lipofílicas producidas por microalgas del género *Dinophysis*, han sido detectadas en episodios de Floraciones Algales Nocivas (FAN) en Chile. La variante más común, PTX-2, inhibe la polimerización de la actina en las células y presenta un riesgo significativo para los organismos marinos, especialmente durante su desarrollo temprano. Aunque el impacto de la PTX-2 no ha sido completamente estudiado, se ha observado que puede causar mortalidad en gametos de ostra y daños branquiales en peces. Debido a este riesgo potencial, es crucial evaluar su efecto utilizando modelos biológicos como el pez cebra. En este estudio se evaluó los efectos de la exposición de PTX-2 en el desarrollo embrionario y larval del pez cebra en el rango de concentraciones presentes en la costa chilena. Para obtener embriones de *Danio rerio* (línea Tab5), se mantuvieron los reproductores en condiciones controladas y se recolectaron las ovas mediante un sistema de parideras, seleccionando los huevos fertilizados bajo lupa estereoscópica. Se utilizaron viales de vidrio para prevenir la adsorción de pectenotoxina, una biotoxina lipofílica, y se establecieron concentraciones de 0,8; 1,6 y 3,2 µg/L. Se incluyeron controles negativos (medio E3), positivos (3,4-dicloroanilina), y uso del solvente DMSO. Los embriones y larvas se expusieron a las toxinas en placas de 24 pocillos, evaluando parámetros morfométricos, actividad locomotora y neurotoxicidad mediante ensayos de enrollamiento de cola y medición de actividad bajo ciclos de luz/oscuridad. Los resultados muestran que la pectenotoxina, en las concentraciones probadas, no causa mortalidad ni malformaciones en embriones o larvas de pez cebra, solo se ve afectada el área de saco vitelino en larvas recién eclosionadas. Por otra parte, se encontró una disminución en la actividad locomotora y efectos neurotóxicos en larvas de 3dpf a concentraciones entre 0,80 y 3,2 ug/L. El DMSO utilizado como solvente no es adecuado para ensayos de neurotoxicidad embrionaria puesto que genera interferencias en los resultados aun por debajo del 1% utilizado.

Introducción

Las floraciones algales nocivas (FANs) son eventos naturales que ocurren en cuerpos de agua. Estas corresponden a un aumento en el número de las microalgas presentes, dada por condiciones ambientales específicas que promueven el sobrecrecimiento de estas (Sellner et al., 2003). Existe un grupo de microalgas que produce biotoxinas las cuales pueden generar daño a la biota marina y también al ser humano. En Chile, los eventos FANs se han reportado desde la década de los 60, en distintas zonas del país, identificándose 3 grupos de toxinas: Veneno paralizante de mariscos (VPM), Veneno amnésico de mariscos (VAM) y las biotoxinas marinas lipofílicas (anteriormente denominadas veneno diarreico de mariscos VDM; Sandoval et al., 2018). Este último grupo se caracteriza por su naturaleza lipofílica, lo que provoca que se pueda acumular en los tejidos grasos de los organismos. Dentro de este conjunto podemos encontrar distintos tipos de biotoxinas tales como las Dinofisistoxinas (DTXs), Azaspirácidos (AZA), Yessotoxinas (YTX), Ácido okadaico (OA) y las Pectenotoxinas (PTX)(Cortes, 1998; Diaz et al, 2019; FAO, 2004).

Las PTXs son una familia de biotoxinas poliéteres macrocíclicos que son producidas junto al ácido okadaico y sus derivados exclusivamente en microalgas del género *Dinophysis*. En cuanto a sus efectos toxicológicos, no hay tanta información como en el caso de otras biotoxinas marinas, además, posee un gran número de congéneres, algunos derivados de la interacción con los moluscos. A la fecha se han identificado sólo cuatro análogos: PTX-2, PTX-12, PTX-11 y PTX-13 (Blanco et al., 2005) siendo la PTX-2 la toxina más comúnmente producida por especies de *Dinophysis* spp. (Domínguez et al., 2010). Se ha reportado que la toxicidad en los organismos varía según la molécula estudiada. Por ejemplo, Yasumoto et al. (1985) informaron que la dosis letal de PTX-1 y PTX-2 inyectadas intraperitonealmente a ratones era de 250 y 260 ug/kg respectivamente. Por otro lado, Ito et al. (2008) estudiaron el efecto de la PTX-6 en ratones por vía peritoneal, lo que dio como resultado hemorragia en el hígado, lesiones en los órganos gástricos y en los riñones, concluyendo que la dosis letal para de PTX-6 era de 500ug/kg, siendo así menos tóxica que la PTX-2.

La más común dentro del grupo de PTXS y con ello la más estudiada es la PTX-2. A nivel molecular, se ha descubierto que es capaz de inhibir la polimerización de la proteína actina en las células, siendo este efecto dependiente de la concentración de toxina (Hori et al 1999). La actina es una proteína filamentosa citoesquelética que está asociada al crecimiento, movimiento y forma de las células. Otros estudios han demostrado que la PTX-2 posee un efecto sobre el ciclo celular, induciendo la detención en la fase G2 (Moon et al., 2008; Kim et al., 2011; Shin et al., 2011). Esta fase es antecesora directa de la mitosis y juega un papel crucial en el proceso de la división celular; una detención en

esta fase impediría la ejecución de la división celular, desencadenando diversas implicancias a nivel microscópico (Kim et al., 2011). Entre el transcurso de la fase G2 ocurren varios procesos, dentro de ellos se destaca la capacidad de reparar los posibles daños en el ADN que se producen durante esta etapa. En consecuencia, se evidencia que la fase G2 es esencial para el mantenimiento del equilibrio celular.

Los organismos marinos son susceptibles a la interacción con PTX-2 durante floraciones algales nocivas, ya sea por la alimentación directa de las microalgas tóxicas o por la exposición física con estas biotoxinas disueltas en el agua. Sin embargo, existen pocos estudios que detallen el impacto que puede tener la PTX-2 en ellos. En invertebrados Gaillard et al. (2020) evaluaron el efecto de la PTX-2 en la calidad de los gametos de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*. El estudio reveló que la exposición a concentraciones entre 4,3 y 42,95 µg/L PTX redujo el éxito de la fertilización entre ovocitos y espermatozoides cuando fueron pre expuestos a esta toxina. Esto sugiere que existe una alteración en las características celulares de los gametos, lo cual podría estar asociado al deterioro del citoesqueleto de los ovocitos y espermatozoides, provocado por la inhibición de la polimerización de la actina, la cual está involucrada a la motilidad de los espermatozoides y en la penetración de estos al ovocito (Gaillard et al., 2020). Otro estudio en moluscos indica que 179 µg PTX2/L (equivalente a 10.000 células *Dinophysis*/mL) induce mortalidad a las 48 hrs de al menos 50% en larvas de 7 días de edad en la ostra *Crassostrea virginica* (Pease et al., 2022).

En cuanto a vertebrados acuáticos, como peces, existe solo un estudio hasta el momento en donde se expone a larvas de pez ovejuna (*Cryprinodon variegatus*) de tres semanas de edad, a concentraciones de 4,3; 42,95; 214,75; 644,25; 859; 1718 y 3436 µg/L PTX-2 por 96hrs. Como resultado, las concentraciones mayores a 214,75 µg/L indujeron mortalidad en los individuos, derivado de una insuficiencia respiratoria como consecuencia del daño en los epitelios branquiales. Se observó hinchazón en la estructura branquial, desorganización celular y necrosis. En las concentraciones más altas, se observó la generación de hiperplasia e hipertrofia en estas estructuras (Gaillard et al., 2023).

PTXs en Chile

En Chile se puede encontrar presente el género *Dinophysis* a lo largo de toda la costa (Díaz et al., 2022). Las concentraciones reportadas de PTXs varían dependiendo de las matrices que se consideren. En el norte de Chile, para las regiones de Atacama y Coquimbo, se han encontrado concentraciones de 180 pg PTX2 /célula (Blanco et al., 2007). Por otra parte, Alves-de-Souza et al., (2014) reportaron 0,0022 µg/L PTX-2 en muestras pertenecientes al fiordo de Reloncavi. Otros informes reportan 2,3 µg kg⁻¹ en muestras del bivalvo *Tagelus dombeii* pertenecientes a la Bahía de Tubul, en el Golfo de Arauco, Región del Biobío (Díaz et al., 2020).

Las regiones más afectadas por las toxinas lipofílicas corresponden a la región de Los Lagos, Aysén y Magallanes (Díaz et al., 2022), áreas conocidas por su intensa actividad pesquera y acuícola (Estay & Chávez, 2017), lo que implica que un evento de FANs podría tener repercusiones significativas en las poblaciones humanas que sustentan dichas actividades. Por lo tanto, es crucial comprender como las distintas toxinas lipofílicas afectan a los organismos del medio en las diferentes etapas de vida, especialmente durante los primeros estados tempranos, los cuales son fases esenciales para la repoblación y conservación de las especies. Los antecedentes entregados, indicarían que existe un potencial riesgo aún no estudiado de forma completa para la población marina expuesta a floraciones algales nocivas que contengan Pectenotoxinas, por lo tanto, es necesario evaluar el daño producido, utilizando por ejemplo modelos biológicos como el pez cebra.

Pez cebra como modelo

El pez cebra (*Danio rerio*) es una especie de origen tropical el cual ha sido ampliamente estudiado y utilizado como modelo biológico en investigaciones relacionadas a toxinas con relevancia en la salud humana y ambiental (Teame et al., 2019). Este pez exhibe diversas características que lo hacen ideal como modelo experimental. Dentro del punto de vista físico, destaca su pequeño tamaño, lo que facilita su manipulación, permitiendo tener varios individuos en espacios reducidos. Además, durante su desarrollo embrionario y larval presentan una transparencia óptica y permeabilidad a moléculas pequeñas, lo que es una ventaja para el estudio visual de estructuras y órganos. Por otro lado, presentan una alta fecundación y rápido crecimiento, lo que posibilita la obtención de numerosos individuos en un corto periodo de tiempo. (Hill et al., 2005). En 1995, Kimmel et al., definieron las etapas del desarrollo embrionario y larval del pez cebra en horas post fecundación (hpf) y días post fecundación (dpf) a los 28,5°C, definiendo una escala estándar de desarrollo, los cuales han podido definir bien cada etapa y así estandarizar los estudios posteriores.

Dada las características mencionadas es que se ha podido evaluar el efecto de contaminantes o estresores ambientales en el desarrollo normal de esta especie. Por esta razón, se han implementado pruebas de toxicidad aguda para evaluar el efecto de distintos productos químicos en embriones de pez cebra (OCDE, 2013). Los efectos producidos son variados y dependerán del compuesto químico considerado, la concentración y el estado de desarrollo considerado. Por ejemplo, la 3,4-dicloroanilina (3,4DCA 4 mg/L) produce coagulación en huevos recién fecundados (Von Hellfeld et al., 2020), el ácido hexanoico (74 mg/L) indujo la formación de edemas de tipo pericárdico y de saco vitelino en larvas recién eclosionadas. Otros compuestos como el ácido 2,2-dimetilvalérico (285 mg/L), puede provocar en larvas tempranas efectos subletales como reducción en el tamaño de los ojos.

También se ha demostrado que el pez cebra es sensible a las biotoxinas tanto marinas como de agua dulce por lo que se han desarrollado bioensayos para comprender el daño y reducir el riesgo de intoxicación por contaminación de alimentos (Barrio et al., 2015; Vargas et al 2015). Dentro de las biotoxinas marinas lipofílicas que se han estudiado en pez cebra está el ácido Okadaico, el cual se ha demostrado que genera hepatotoxicidad a las 24h de exposición en larvas de 5 días post fecundación (Pepe, 2022). También en esta misma toxina Yañez-Bailey (2022) encontró que la exposición por inmersión a una concentración de 0,1 ng/mL genera neurotoxicidad en larvas de la misma edad. También Barrio et al (2015) estudió el efecto de tres biotoxinas marinas: STX, Ácido Okadaico y Ácido Domoico encontrando que en embriones de pez cebra entre las 2 y 48 hpf se inhibe el desarrollo de estos. Los efectos tóxicos dependieron de la dosis, siendo letal 5,6 ng de STX/g de pez, 500 ng de AO/g de pez y 2700 ng de AD/g de pez, respectivamente.

Los antecedentes expuestos evidencian que el pez cebra es un candidato óptimo para investigar los efectos de biotoxinas marinas lipofílicas como la PTX-2, la cual, como se mencionó anteriormente, se encuentra presente a lo largo de toda la costa de Chile. En este estudio se propone analizar la mortalidad y alteraciones del desarrollo embrionario y larval de esta especie modelo expuestas a concentraciones de PTX-2 presentes en las costas chilenas.

Hipótesis

1. La exposición a la toxina PTX-2 en concentraciones presentes en la costa chilena induce alteraciones en el desarrollo embrionario y larval del pez cebra (*Danio rerio*).
2. La exposición de la toxina PTX-2 en concentraciones presentes en la costa chilena induce neurotoxicidad en estados tempranos del pez cebra (*Danio rerio*).

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los efectos de tipo estructurales y neurológicos de la exposición de PTX-2 en el desarrollo embrionario y larval del pez cebra en el rango de concentraciones presentes en la costa chilena.

Objetivos específicos

- 1.-Cuantificar la mortalidad, malformaciones, tiempo de desarrollo y movimientos involuntarios en embriones de pez cebra expuestos a concentraciones naturales de PTX-2 en costas chilenas en comparación con condiciones sin toxina.
- 2.-Cuantificar la mortalidad, malformaciones, anomalías morfológicas y actividad locomotora en larvas tempranas desde la eclosión hasta la absorción del vitelo en concentraciones naturales de PTX-2 en costas chilenas en comparación con condiciones sin toxina.
- 3.- Evaluar neurotoxicidad en embriones y larvas de pez cebra expuestos a concentraciones naturales de PTX-2 en costas chilenas en comparación con condiciones sin toxina.

Materiales y métodos

1. Obtención de embriones

Para obtener los embriones se dispuso de reproductores de *Danio rerio* (línea Tab5). Para la mantención de los peces fueron utilizados estanques de vidrio de 15 L, los cuales se mantuvieron en condiciones controladas con una temperatura de 27 ± 1 °C, oxigenación continua, sistema de filtración UV, conductividad entre $500-700 \mu\text{S}/\text{cm}^3$, un pH entre 7,0-7,4, fotoperiodo de 14hL:10hO horas y una alimentación de dos veces al día con pellets de 300 μm .

Para la obtención de las ovas, se instaló en dichos estanques un sistema de parideras, que consisten en cajas plásticas con doble fondo. Las ovas depositadas en el sistema de cajas por los reproductores fueron extraídas mediante un filtrado con un tamiz de 500 μm . Seguidamente, mediante observación bajo lupa estereoscópica Stemi DV4 (Karl Zeiss), se seleccionaron los huevos fertilizados según su simetría, homogeneidad y uniformidad según lo descrito por Beekhuijzen et al. (2015). Los embriones fueron mantenidos en medio E3 (NaCl 5mM; KCl 0,17mM; CaCl₂ 0,33mM; MgSO₄ 0,33mM) a 28°C en cámara termostregulada hasta el montaje de los experimentos (Figura 1).

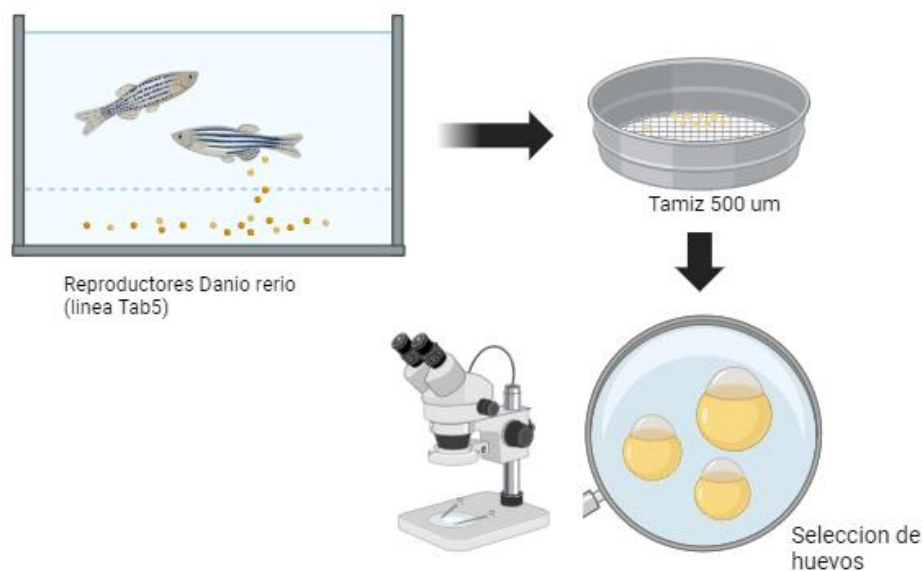


Figura 1. Procedimiento de obtención de ovas y posterior selección bajo lupa.

2. Prevención adsorción toxinas

Investigaciones pasadas han reportado que toxinas pertenecientes al grupo de las biotoxinas lipofílicas como el Ácido Okadaico, presentan una adsorción a materiales plásticos de poliestireno (Costa et al. 2020), material comúnmente utilizado en varios materiales de laboratorio. La pectenotoxina está considerada dentro del grupo de las biotoxinas lipofílicas, por lo que, para evitar una posible interacción entre la toxina y material de laboratorio plástico, se optó por utilizar viales de vidrio de 1,5 ml en los procesos de exposición.

3. Concentraciones de los tratamientos

Para establecer las concentraciones que corresponderían a los tres tratamientos con toxinas, se llevó a cabo una revisión bibliográfica (Tabla 1) con los valores de concentración de esta toxina presentes en entornos naturales. A partir de este análisis se definieron las concentraciones de 0,8; 1,6, y 3,2 µg/L que corresponden al rango encontradas en las costas de Chile.

Tabla 1. Concentraciones de PTX-2 obtenidas en muestras de agua mediante análisis de espectrometría de masas y HPLC.

Concentración (µg/L)	Localidad	Referencia
0,00117	East China Sea	Xiaoqing TIAN et al.,(2022)
0,00119 – 0,10188	Daya Bay China	Yang Liu et al., (2020)
0,49 – 14,4	Bohai Sea,China	Junhui Chen et al., (2018)
0,0325	Queen Charlotte Sound, Nueva Zelanda	MacKenzie et al., (2005)
0,0534	Buller Bay, Nueva Zelanda	MacKenzie et al., (2005)
107,5	Westport Nueva Zelanda	MacKenzie et al., (2005)
0,000 18	Bahía Inglesa, Chile	Blanco et al., (2007)

0,0022	Fiordo de Reloncavi, Chile	Alvez de Souza et al., (2014)
0,82	Fiordo Puyuhuapi, Chile	Diaz et al., (2021)
1,9	Fiordo Puyuhuapi, Chile	Baldrich et al., (2021)

4.- Preparación estándar PTX y soluciones.

Se utilizó un estándar de toxina proveniente del Consejo Nacional de Investigación de Canadá. Esta solución estándar de pectenotoxina se encuentra suspendida en metanol, un compuesto reportado como neurotóxico en concentraciones de 0,5% y 1% (Pacheco et al., 2006). Por este motivo, se decidió extraer 100 µl de una ampolla estándar para ser evaporado hasta sequedad con un concentrador de nitrógeno a 50°C con aireación constante del gas. Seguidamente el extracto se resuspendió en 100 µl de Dimetil sulfoxido (DMSO) al 0,2%. El DMSO es un disolvente polar, comúnmente utilizado como vehículo para solubilizar compuestos lipofílicos en pruebas de toxicidad (Rhiannon et al., 2012). En embriones de pez cebra se conoce que toleran bien la sustancia al menos a concentraciones de 2,5% (Maes et al., 2012). Posteriormente para homogeneizar la solución preparada de toxina más DMSO, fue llevada 60 segundos a vortex y posteriormente pasada a centrifuga por 10 minutos.

5.- Controles.

Se establecieron tres grupos de control: un control negativo con medio E3, un control positivo y un control con solvente. Para seleccionar el control positivo, se realizó una estandarización utilizando embriones recién fecundados, los cuales fueron expuestos a 3,4-dicloroanilina, una sustancia altamente tóxica que se produce como subproducto de la transformación de herbicidas y que se usa como toxico de referencia en estudios de toxicidad para el desarrollo (Monteiro et al., 2006; OECD, 2013). Las concentraciones utilizadas fueron de 3 mg/L, 3,5 mg/L, 4 mg/L, 4,5 mg/L, 5 mg/L y 5,5 mg/L. Se evaluó la supervivencia, la tasa de eclosión y la presencia de edemas a las 24, 48 y 72 horas de exposición, respectivamente. El control con solvente consistió en DMSO, la sustancia en la que se suspendió el estándar de pectenotoxina, utilizando concentraciones de 0,00112 %, 0,00224 % y 0,00452 %, equivalentes al porcentaje de DMSO presente en las concentraciones de PTX empleadas.

6.- Diseño experimental ensayo desarrollo embrionario.

Los huevos recién fecundados que fueron seleccionados se trasladaron a una placa de 24 pocillos, que contó con recipientes de vidrio. Se utilizaron 5 individuos por pocillo siendo 3 las réplicas para los tratamientos y 3 grupos control. La placa fue mantenida en una incubadora (VELP) la cual se mantuvo con una temperatura de 28°C. Cada 24hrs cada pocillo fue revisado con el objetivo de evaluar la mortalidad, tasa de eclosión, presencia de edemas, malformaciones de cola como lordosis hasta llegar a las 96h cuando los huevos eclosionaron (Figura 2).



Figura 2. Ilustración de las etapas que incluye el desarrollo embrionario utilizado para el ensayo. El ensayo comienza con la exposición a la toxina una vez fecundados los huevos y termina cuando los embriones pasan a larvas, teniendo aun su saco vitelino.

Luego los individuos ya larvas fueron pasadas placas Petri, separadas según tratamiento, luego anestesiadas con 10mg de tricaina y fotografiadas con el objetivo de tomar medidas de longitud total, área saco vitelino, área ojo y área capsula ótica (Figura 3). Para ello fue utilizada una cámara Cannon EOS Rebel T3, que está incorporada a la lupa estereoscópica; posteriormente las fotos fueron procesadas con el software ImageJ®.

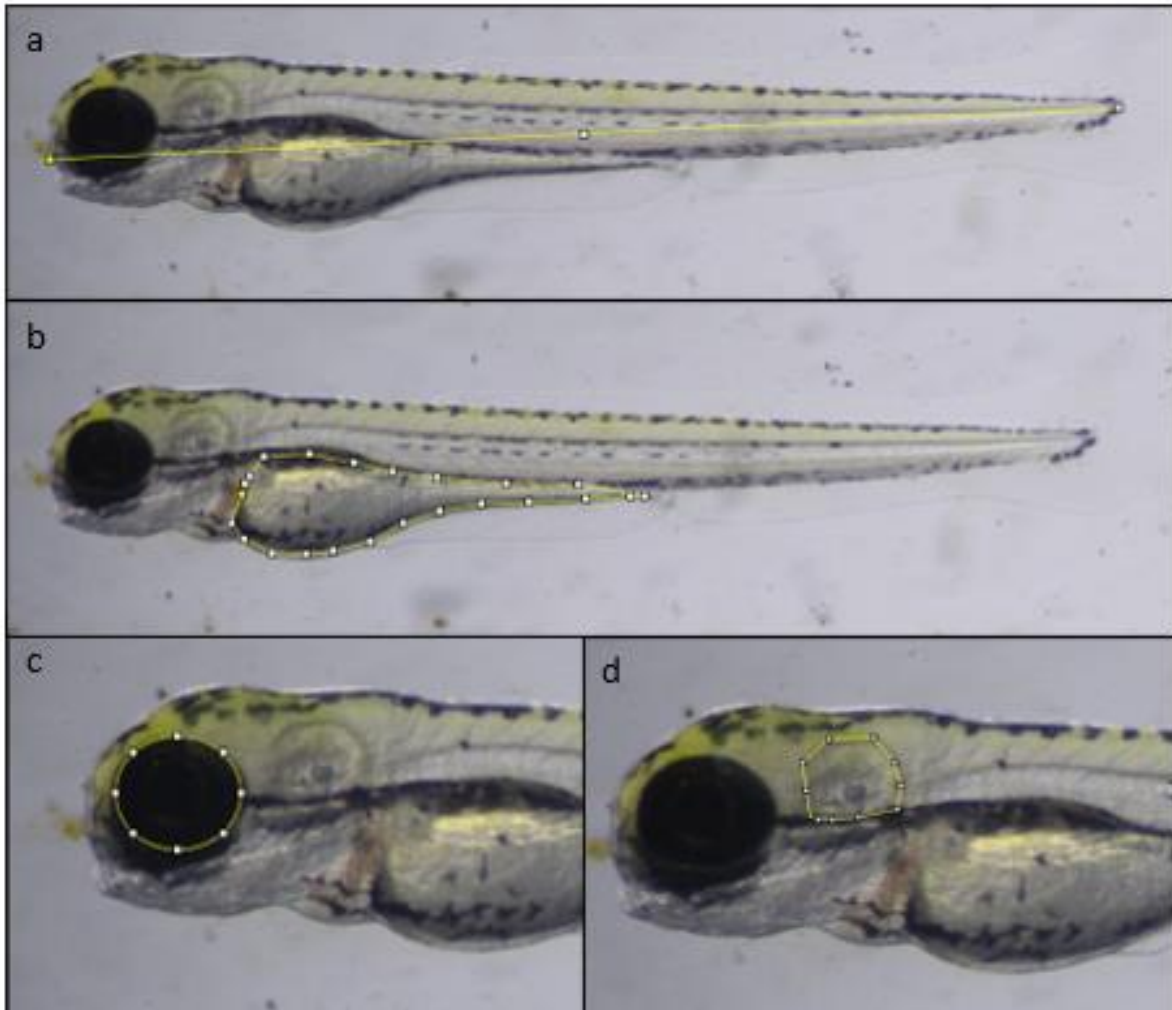


Figura 3. Fotografías detalle de las mediciones realizadas. a) fotografía de medición de longitud total b) fotografía medición área de saco (Aumento 4x) c) fotografía medición área de ojo d) fotografía área de capsula ótica (Aumento 5x).

7.- Diseño experimental ensayo desarrollo larval

Se realizó un ensayo eligiendo larvas de 3 días posts fecundación (dpf) recién eclosionadas. Estas fueron colocadas en viales de vidrio los que se ubicaron en una placa de 24 pocillos. En cada vial se colocó 1 ml de tratamiento junto con 5 larvas, obteniendo así 3 réplicas por concentración de toxina (0,80 ug/L, 1,6 ug/L y 3,2 ug/L) medio E3 (control negativo), 3,4-DCA (control positivo) y los respectivos controles solventes (DMSO). Luego de 2 días de exposición las larvas fueron extraídas

de los viales para ser puestas en placas Petri, observadas y fotografiadas bajo lupa para posteriormente realizar mediciones de longitud total, área de saco vitelino, área de ojo y área de capsula ótica.

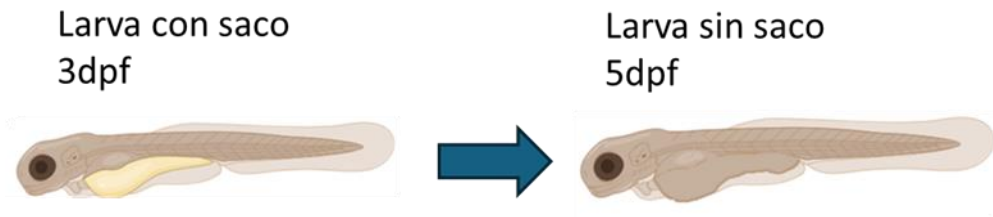


Figura 4. Ilustración que indica las etapas que abarca el estudio del desarrollo larval. El ensayo comienza con la exposición de larvas de 3dpf y termina cuando la larva absorbe su saco a los 5dpf.

8.-Evaluacion movimiento espontáneo de cola y actividad locomotora.

Para evaluar el movimiento espontáneo de cola durante el desarrollo embrionario, se seleccionaron al azar 12 de los 15 embriones obtenidos por tratamiento, después de 24 horas de exposición a la toxina. Estos embriones se trasladaron individualmente a una placa de 96 pocillos con fondo curvo, cada uno conteniendo 100 μ l de medio E3. Luego, la placa se colocó en el equipo Wmicrotracker® (Phylum Tech) que se ubicó sobre almohadillas antivibración dentro de una cámara de incubación (VELP) a una temperatura constante de 25°C. El movimiento espontáneo de cola del embrión se midió en la oscuridad durante 20 minutos.

Para evaluar la actividad locomotora en larvas tempranas, se recolectaron larvas recién eclosionadas. Luego de 48 horas de exposición, se seleccionaron aleatoriamente 12 de las 15 larvas obtenidas por tratamiento. Estos individuos fueron transferidos a una placa de 96 pocillos con fondo plano, colocando una larva en cada pocillo, cada uno con 100 μ l de medio E3. Al igual que en el ensayo inicial, la placa se ubicó en el equipo Wmicrotracker®, sobre almohadillas antivibración dentro de una cámara de incubación (VELP) a 25°C constantes. La actividad locomotora se midió en condiciones de oscuridad durante 20 minutos.

9.-Diseño experimental neurotoxicidad mediante ensayo enrollamiento de cola en embriones de pez cebra.

El ensayo de enrollamiento de cola es un método que se ha propuesto con el objetivo de detectar neurotoxicidad en embriones. En este ensayo se estudia el movimiento espontáneo de la cola del pez cebra (Figura 5) que se produce desde las 17hpf y disminuye a partir de las 27 hpf (Saint-Amant & Drapeau, 1998). Siguiendo el protocolo de De Oliveira et al. (2021) que demuestra que entre las 22 y 29 h los embriones presentan una actividad de enrollamiento constante, es que se expuso embriones recién fecundados a 3,2 ug/L de PTX, con su respectivo control solvente de 0,00452% de DMSO por 24h. Luego de transcurrido este tiempo fueron seleccionados 8 individuos por tratamiento, los cuales fueron trasladados a una placa de 96 pocillos de fondo curvo, posicionando un embrión por pocillo en un volumen de 100 µL. La placa fue instalada en el microtracker (Phylum Tech). El equipo se ubicó sobre almohadillas antivibración dentro de una cámara de incubación (VELP) a una temperatura constante de 25°C. Una vez situada la placa, se midió la actividad durante 20 minutos de acondicionamiento en oscuridad y luego 60 minutos con intervalos de luz/oscuridad de 10 min cada uno.

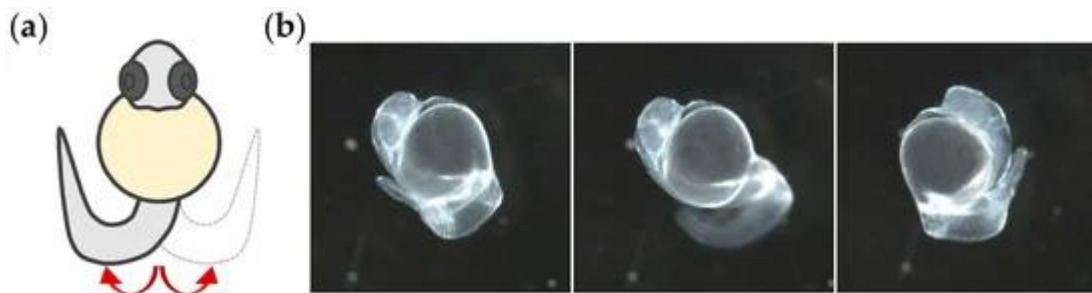


Figura 5. Actividad de enrollamiento de la cola en embriones de pez cebra. a) Esquema que muestra la dirección de los movimientos de la cola b) Embrión descorionado a las 26hpf mostrando el enrollamiento de la cola de forma consecutiva. Figura extraída de De Oliveira et al. (2020)

10.- Diseño experimental Neurotoxicidad mediante ensayo de medición de actividad locomotora

Siguiendo el protocolo de Manohar et al., (2019) quien propone exponer a larvas a al menos tres ciclos de luz /oscuridad de 10 minutos de duración cada uno para evaluar neurotoxicidad, es que se expuso a larvas recién eclosionadas a concentraciones de 0,80 ug/L; 1,6 ug/L y 3,2 ug/L de PTX por 48h. Luego de transcurrido este tiempo fueron seleccionados al azar 8 de 15 individuos por tratamiento, los cuales fueron trasladados a una placa de 96 pocillos, posicionando una larva por pocillo en un volumen de 100 uL. La placa fue instalada en el microtracker (Phylum Tech). El equipo

se ubicó sobre almohadillas antivibración dentro de una cámara de incubación (VELP) a una temperatura constante de 25°C. Una vez situada la placa, se midió la actividad durante 20 minutos de acondicionamiento en oscuridad y luego 60 minutos con intervalos de luz/oscuridad de 10 min cada uno.

11.- Análisis estadístico

Los datos fueron analizados a través del software GraphPad Prism, LLC (versión 9.2.0). Se llevaron a cabo test de normalidad (Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Sminorv) y homogeneidad de varianza (Test de Levene) con el objetivo de definir si se deben aplicar pruebas paramétricas o no paramétricas como ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis respectivamente. En el caso de que fueran paramétricas se realizaron comparaciones múltiples entre los tratamientos con el test de Tukey y cuando no fueron paramétricas se realizó el test de Dunn. En el caso de los datos expresados en porcentaje como la supervivencia o la eclosión, antes de aplicar las pruebas estadísticas, se aplicó la transformación arcoseno.

Resultados

1.- Control positivo: 3,4 DCA

Los resultados obtenidos para definir la concentración indicada de 3,4DCA para ser incluido como control positivo en los siguientes ensayos mostraron que la mayor mortalidad se presentó a las 72h, en donde para concentraciones mayores a 4,5mg/L, la sobrevivencia se redujo en más del 50%, llegando a 0% en los tratamientos de 5 y 5,5 mg/L. En la mayoría de los casos se observó la coagulación de los huevos a las 24 h de exposición (Figura 6 a). En todas las concentraciones se observaron anomalías del desarrollo como la presencia de edemas pericárdicos o de saco vitelino. (Figura 6 b). Sobre la base de estos resultados, se eligió la concentración de 3mg/L como control positivo, que, si bien induce mortalidad, esto no fue total, logrando así observar por más tiempo las alteraciones del desarrollo presentadas en las larvas vivas.

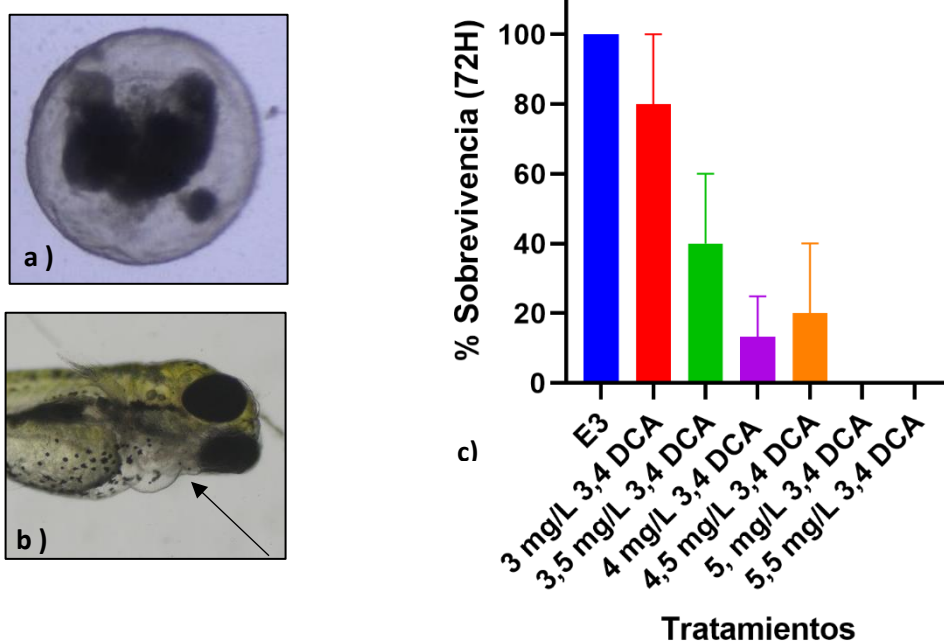


Figura 6. Estandarización control positivo. a) Huevo coagulado a las 24h post exposición. b) Detalle de presencia de anomalías en larva recién eclosionada: flecha indica edema del saco y edema pericárdico. c)Supervivencia de larvas expuestas a distintas concentraciones de 3,4 dicloroanilina.

2.- Ensayo desarrollo embrionario

En total se realizaron 3 ensayos para evaluar la toxicidad de la pectenotoxina en el desarrollo embrionario del pez cebra. En el primer ensayo (Figura 7) se observó a las 96h, cuando los huevos ya habían eclosionado, una mortalidad en el control positivo y en los tratamientos con mayor concentración de PTX, alcanzando una supervivencia de 93% en 1,6ug/L y un 86% en 3,2 ug/L de la toxina. Sin embargo, también se observó una supervivencia de 73% en el control negativo, en base a estos resultados se decidió descartar este ensayo por la mortalidad en el control negativo y repetirlo, pero solo con la concentración más alta equivalente a 3,2 ug/L de PTX. No se observaron edemas ni malformaciones en los individuos estudiados.

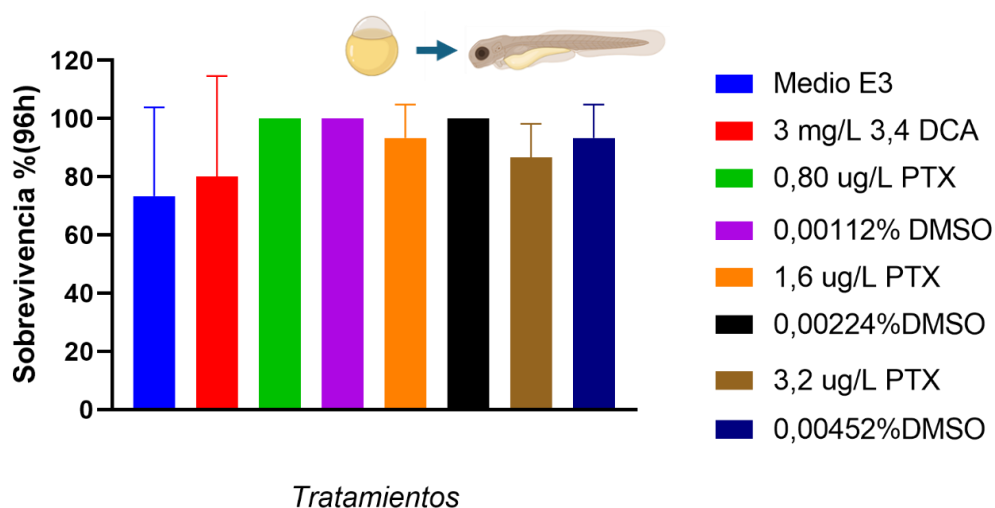


Figura 7. Porcentaje supervivencia primer ensayo a las 96h post exposición. Cada barra corresponde al promedio de tres replicas (5 larvas/replica) de supervivencia a las 24h de exposición de medio E3 (control negativo), 3 mg/L de 3,4 DCA (control positivo) y DMSO en distintas concentraciones como control solvente. No se presentan diferencias significativas entre tratamientos. (K-W $p=0,3901$).

En el segundo ensayo para evaluar la toxicidad de la pectenotoxina en el desarrollo embrionario del pez cebra hasta las 96 hpf, a diferencia del anterior solo se midió con un control negativo, el control positivo y la concentración más alta evaluada anteriormente equivalente a 3,2 ug/L de PTX, con su respectivo control solvente (0,00452% DMSO). Se observó una alta supervivencia a las 96h post eclosion en todos los tratamientos (100%) excepto en el tratamiento con 3,2 ug/L de PTX (Figura 8

a). En este, la supervivencia de los individuos a las 96h alcanzó el 93%; pero no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (K-W $p>0,99$).

En cuanto a la eclosión (Figura 8 b) se puede observar que a las 96h, post exposición esta ocurrió en un 100% en el medio E3 y el control solvente de toxina (0,00452%DMSO), mientras que en el control positivo con 3,4DCA alcanzó el 70% y el tratamiento con pectenotoxina no alcanzó el 50% de larvas eclosionadas. No se observó edemas ni malformaciones en los individuos ya eclosionados; ni diferencias significativas entre los tratamientos (K-W $p= 0,4436$).

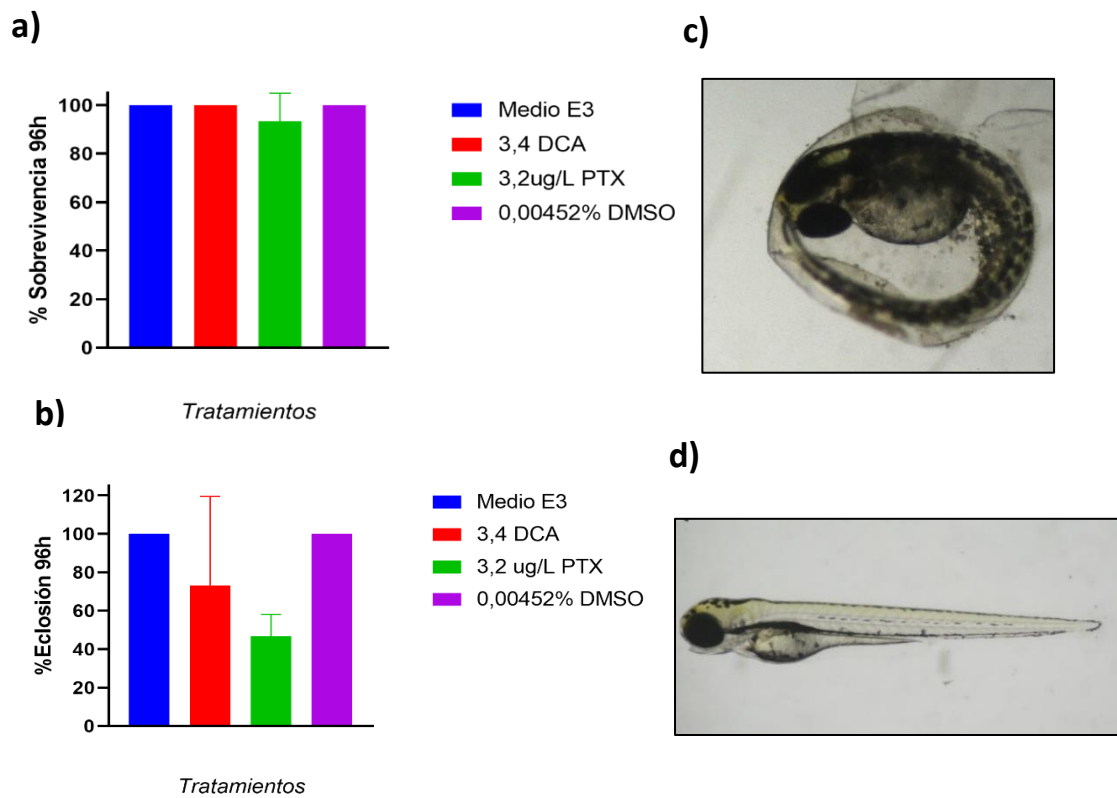


Figura 8. Resultados segundo ensayo desarrollo embrionario a) Porcentaje supervivencia segundo ensayo a las 96h. Corresponde al promedio de tres replicas (5 huevos/replica) de supervivencia a las 96h de exposición al medio E3, 3mg/L 3,4DCA, 3,2 ug/L de PTX y su respectivo control solvente (0,00452%). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. b) Porcentaje de eclosión a las 96h. Corresponde al promedio de tres replicas (5 huevos/replica) expuestas al medio E3, 3mg/L 3,4DCA, 3,2 ug/L de PTX y su respectivo control solvente (0,00452%) c) fotografía embrión muerto d) fotografía larva recién eclosionada sin malformaciones.

2.1 Evaluación de la longitud total, área de saco vitelino, área ojo y área de capsula ótica en ensayos de desarrollo embrionario con DMSO como solvente.

La evaluación de los parámetros de crecimiento embrional como lo son la longitud total, área del saco vitelino, área del ojo y área del capsula ótica desde la fecundación hasta los 4dpf, indica que solo existieron diferencias significativas entre los tratamientos en las dos primeras medidas. En la longitud total se puede ver (Figura 9a) que de los huevos expuestos al tratamiento con 3,2 ug/L de PTX, las larvas recién eclosionadas crecieron menos en comparación con el control negativo (Tukey $p=0,0058$), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con 3,2 ug/L de PTX y su control solvente (0,00452% Tukey $p=0,4726$). En cuanto al área de saco (Figura 9b) se determinó que las larvas recién eclosionadas en el medio E3 tuvieron menos área de saco que las eclosionadas en los demás tratamientos, siendo las expuestas a toxina las que tuvieron la mayor área del saco y con diferencias significativas con el control negativo (Tukey $p = 0,0127$). Sin embargo, al realizar pruebas estadísticas entre las áreas de saco a la concentración de 3,2 ug/L PTX y su control solvente, no se hallaron diferencias significativas (Tukey $p = 0,2094$), lo que sugiere que disminución en la absorción del vitelo nos sea a causa de la toxina, si no que podría ser causada por el DMSO.

Ensayo desarrollo embrionario sin DMSO como solvente.

Los resultados anteriores mostraron una interferencia de parte del solvente, por lo que se decidió hacer otro experimento, resuspendiendo la toxina directamente en medio E3.

Los resultados de este ensayo mostraron que existió una supervivencia del 100% en todos los tratamientos exceptuando el tratamiento con 3,4 DCA en donde la supervivencia alcanzo el 93% (Figura 10a). En cuanto a la eclosión esta fue de un 100% a las 72h en todos los tratamientos (Figura 10b). Lo anterior muestra que no hay un efecto directo de la toxina y que los efectos observados anteriormente pueden ser atribuidos al solvente.

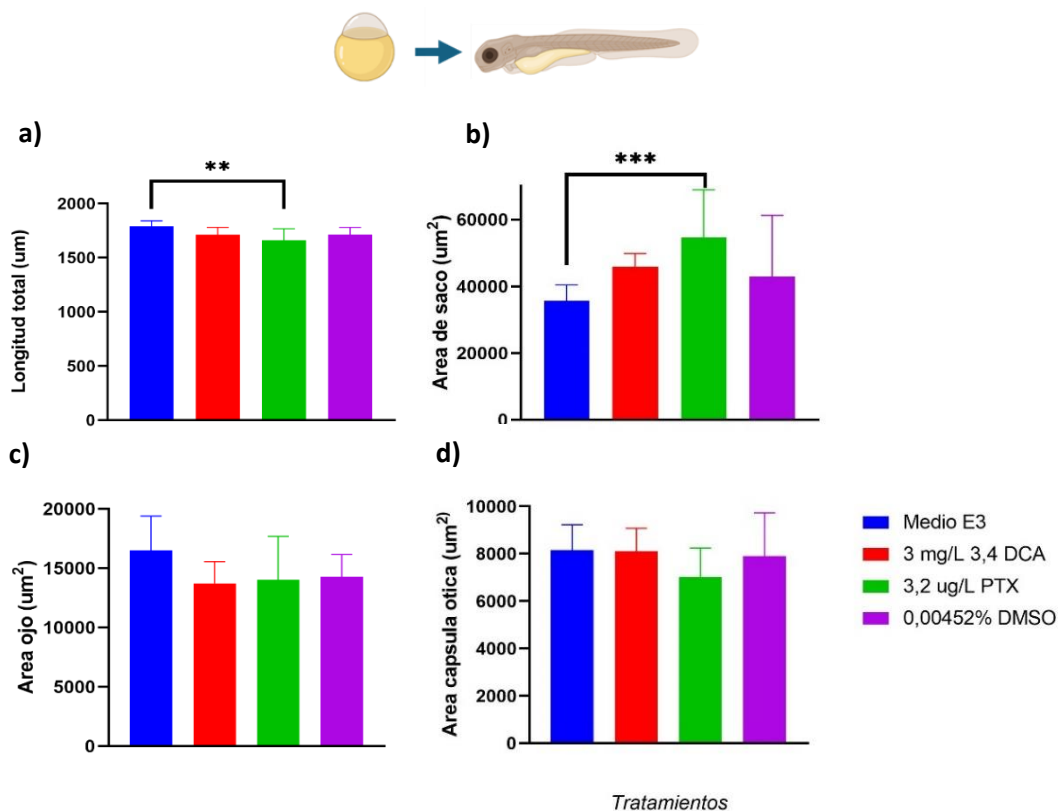


Figura 9. Longitud total, área de saco vitelino, diámetro de ojo y capsula ótica en larvas recién eclosionadas expuestas por 96h a los distintos tratamientos. Los valores corresponden al promedio de tres replicas (5 larvas/replica) luego de 96h de exposición de medio E3, 3 mg/L de 3,4 DCA y 3,2 ug/L de PTX junto con su control solvente (0,00452% DMSO).

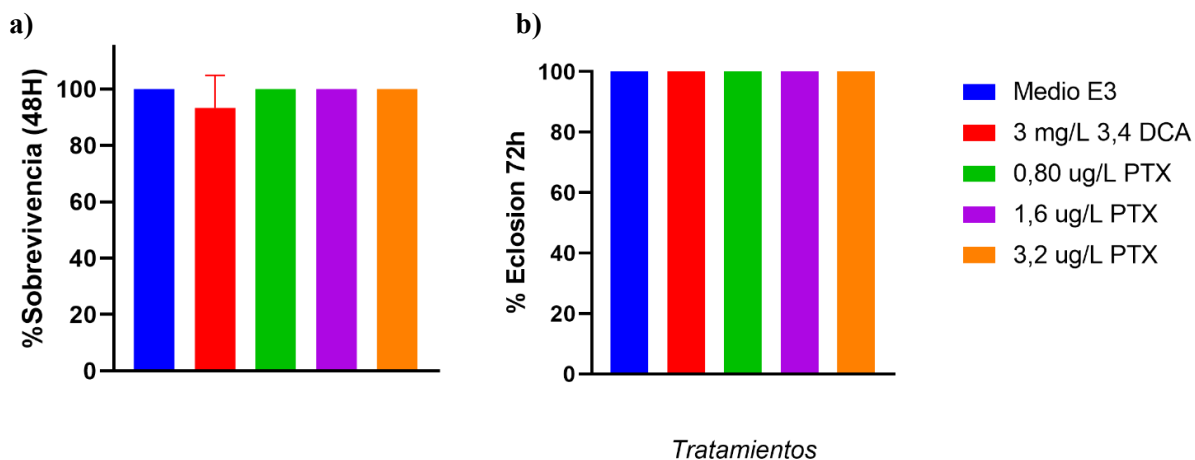


Figura 10. Porcentaje de (a) supervivencia a las 48h y (b) eclosión a las 72h. El valor corresponde al promedio de tres replicas (5 larvas /replica) expuestas a medio E3, 3 mg/L de 3,4 DCA, 0,80 ug/L PTX ,1,6 ug/L de PTX y 3,2 ug/L de PTX.

Evaluación longitud total, área de saco vitelino, área de ojo y área capsula ótica en ensayos de desarrollo embrionario sin DMSO como solvente.

Los resultados obtenidos de la exposición a pectenotoxina durante el desarrollo embrionario sin el DMSO como solvente mostraron que, en relación con la longitud total (Figura 11 a), las larvas recién eclosionadas con mayor tamaño fueron aquellas eclosionadas de huevos incubados en medio E3 (control negativo), alcanzando una media de 1703 μm ; por otro lado, las larvas que menos crecieron fueron las que eclosionaron de huevos expuestos a la 3,4 DCA teniendo una media de 1506 μm . Por otra parte, los análisis estadísticos mostraron que no existe diferencia significativa entre el control negativo y los tratamientos con PTX (ANOVA $p=0,1169$).

En la medición del área de saco vitelino (Figura 11b), los resultados obtenidos mostraron que las larvas eclosionadas del control negativo absorbieron más vitelo en comparación con las demás, obteniendo una media de 30.177 μm^2 . Mientras que las que menos absorbieron vitelo fueron las larvas del tratamiento con 1,6 $\mu\text{g/L}$ de PTX, con una media de 43474 μm^2 . Los análisis estadísticos indicaron que existen diferencias significativas entre el control negativo y los tratamientos con PTX (ANOVA $p=0,0002$). En relación con el área de ojo (Figura 11c) los resultados muestran que las larvas del control negativo tuvieron una mayor área en comparación con los demás tratamientos, siendo el control positivo el que menor área de ojo alcanzó. Los análisis estadísticos mostraron que existen diferencias significativas entre el control negativo y el tratamiento con 3,2 $\mu\text{g/L}$ de PTX (Tukey $p=0,0482$). En relación con la medición de la cápsula ótica, los resultados muestran que las larvas del control negativo fueron las que más área de cápsula ótica tuvieron; mientras que el control positivo fue el que menor área de cápsula ótica obtuvo (Figura 11d). Los análisis estadísticos mostraron que no existe diferencia significativa entre el control negativo y los demás tratamientos con PTX (ANOVA $p=0,3357$).

Evaluación longitud total, ojo y capsula ótica ensayo desarrollo larval sin DMSO como solvente

Los resultados obtenidos de la exposición a pectenotoxina durante el desarrollo larval sin DMSO mostraron que las larvas que en promedio mayor longitud alcanzaron desde los 3dpf hasta los 5dpf fueron las expuestas a 1,6 μg de PTX. Por otro lado, el menor incremento se observó en larvas del control positivo. Los análisis estadísticos realizados mostraron que no hubo diferencias significativas entre el control negativo y los tratamientos con PTX (ANOVA $p=0,6398$) y que solo hubo diferencias significativas entre el control negativo y el control positivo (Figura 10a).

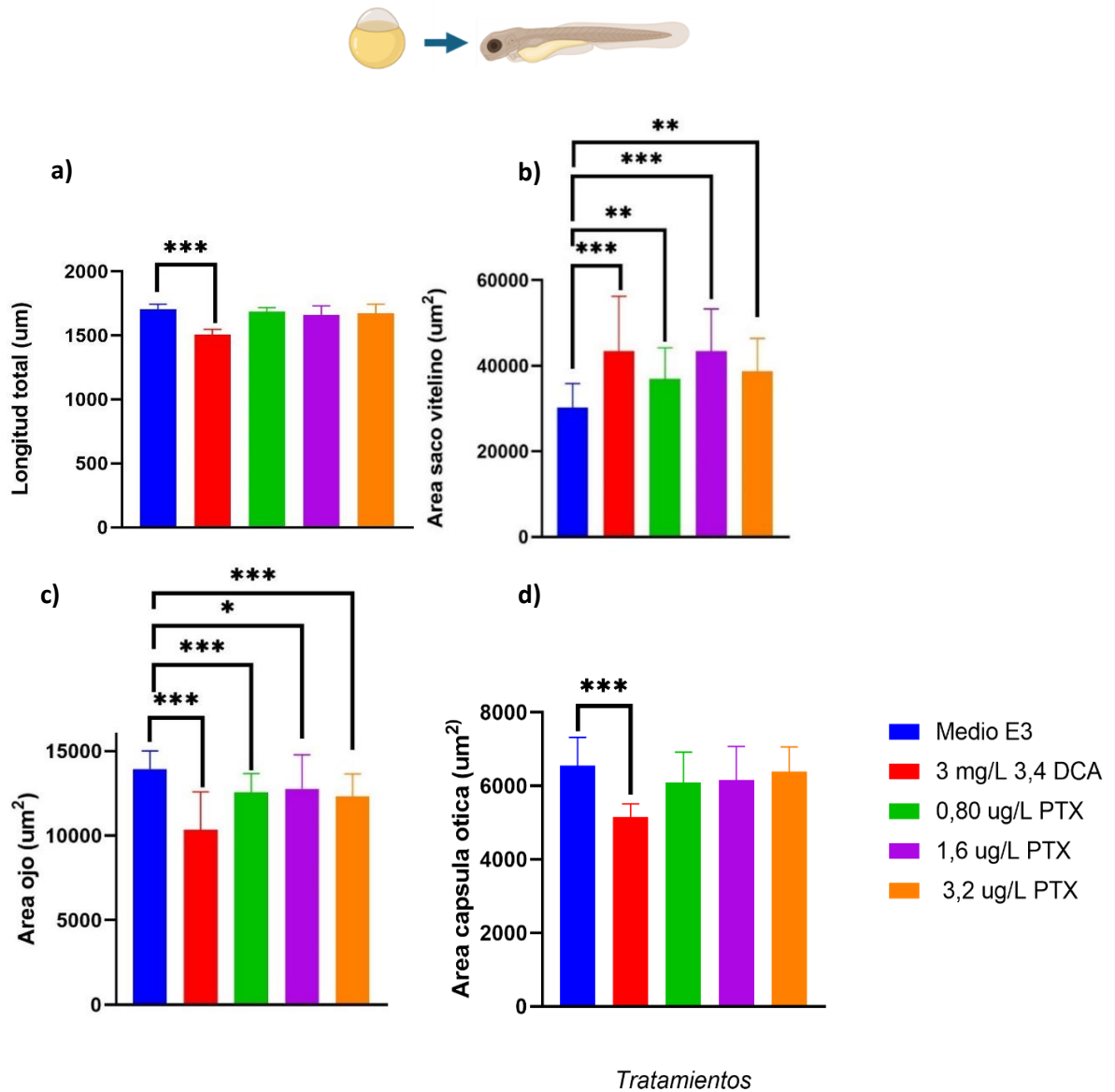


Figura 11. Evaluación longitud total, área de saco vitelino, diámetro del ojo y capsula ótica en ensayo desarrollo embrionario. Cada valor corresponde al promedio de tres replicas (5 larvas/replica) luego de 96h de exposición de medio E3, 3 mg/L de 3,4 DCA , 0,80 ug/L, 1,6 ug/L ,y 3,2 ug/L de PTX.

En cuanto al área del ojo, las larvas que más área de ojo presentaron fueron en el tratamiento con 1,6 ug/L, mientras que las que menos área de ojo tuvieron fueron aquellas del tratamiento con 3,2 ug/L de PTX. Los análisis estadísticos realizados indican que existen diferencias significativas solo entre los tratamientos con 1,6ug/L y 3,2 ug/L (Dunn $p=0,0188$).

Las mediciones de la capsula ótica mostraron que la mayor área fue en el tratamiento con 0,80 ug/L de PTX y el que menos área de capsula ótica tuvo fueron las larvas del control positivo. Los análisis estadísticos indicaron que existen diferencias significativas entre el control positivo y el tratamiento con 0,80 ug/L de PTX (Tukey=0,0026; Figura 10c).

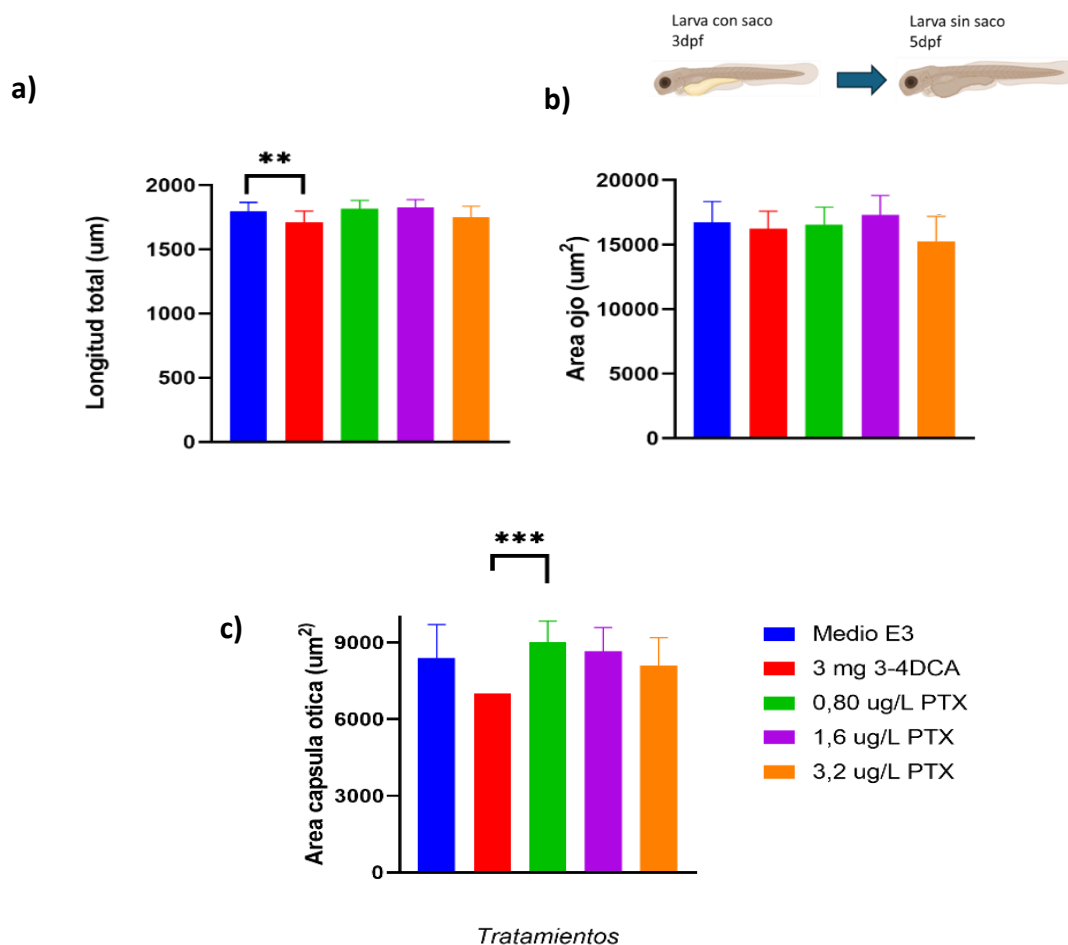


Figura 12: Evaluación longitud total, ojo y capsula ótica ensayo desarrollo embrionario.

Corresponde al promedio de tres replicas (n=5) luego de 96h de exposición de medio E3, 3 mg/L de 3,4 DCA, 0,80 ug/L, 1,6 ug/L y 3,2 ug/L de PTX.

Evaluación actividad locomotora en embriones

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad locomotora en embriones mostraron que los embriones con mayor actividad promedio fueron los expuestos al medio E3, por otro lado, los que menos actividad presentaron fueron los embriones del control positivo, los cuales presentaron diferencia significativa en comparación con el medio E3 (Wilcoxon test $p=0,0004$). Los embriones

expuestos a 3,2 ug/L de PTX y 0,00452% de DMSO no mostraron diferencias en comparación con el medio E3 (K-W = 9121).

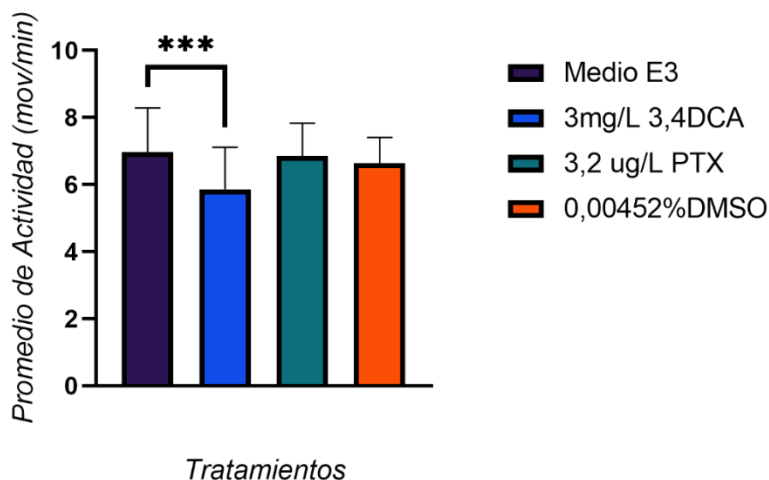


Figura 13: Promedio de actividad de embriones expuestos a medio E3, 3 mg/L 3,4 DCA, 3,2 ug/L PTX y su respectivo control solvente (0,00452%DMSO) luego de 24h de exposición. Los datos se expresan como el promedio de 8 réplicas (1 larva/replica).

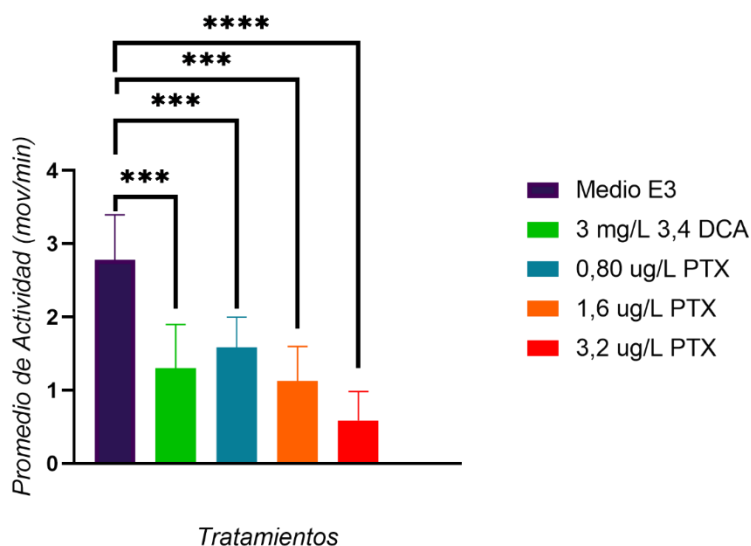


Figura 14. Promedio de actividad de larvas expuestas a medio E3, 0,80 ug/L, 1,6 ug/L y 3,2 ug/L de PTX luego de 48h de exposición. Los datos se expresan como el promedio de 8 réplicas (n=1).

Evaluación actividad locomotora en larvas de pez cebra

Los resultados obtenidos de la actividad locomotora en larvas expuestas a la pectenotoxina muestran que en general, tuvieron menor actividad locomotora en comparación con el medio E3, esta diferencia se puede observar en todas las concentraciones, siendo dosis dependiente (Figura 14; ANOVA $p < 0,0001$).

Evaluación de efecto neurotóxico mediante ensayo enrollamiento de cola en desarrollo embrionario a las 24 h de exposición.

El promedio de la actividad voluntaria medida indica que hay diferencias significativas en los primeros 20 minutos de ensayo, sin embargo, esto en el control positivo solamente (Figura 15a). Luego entre los 50min y 60min en el cambio que corresponde a oscuridad, se nota un aumento en la actividad de los embriones, siendo más alta en el tratamiento con 0,00452% DMSO, el cual solo muestra una diferencia significativa con la concentración de 3,2 ug/L de pectenotoxina (Figura 15b). En los siguientes 10 minutos, la actividad retorna a su nivel basal, observándose una menor actividad en el tratamiento con pectenotoxina en comparación con su control solvente, siendo esta diferencia significativa. Finalmente, en los últimos diez minutos, hay un aumento en el movimiento espontáneo tanto en los tratamientos con PTX como en su control solvente; sin embargo, este incremento no es significativo. Solo se observa una diferencia significativa al comparar el control positivo (3 mg/L 3,4 DCA) con el medio E3.

Evaluación Neurotoxicidad en el desarrollo larval

La actividad locomotora fue evaluada durante 80 minutos con periodos de luz oscuridad de 10 minutos. En la figura 16 se muestra los patrones de actividad locomotora (a) y el promedio de actividad en los periodos de luz/oscuridad.

En general, los patrones y el promedio de actividad locomotora medidos indican que en los periodos de oscuridad, cuando las larvas deberían aumentar su actividad, las larvas expuestas a concentraciones de 1,6 y 3,2 ug/L de PTX no lo hacen de la misma forma que las que se encontraban en el medio E3, manteniendo promedios de actividad significativamente menor (Figura 16b).

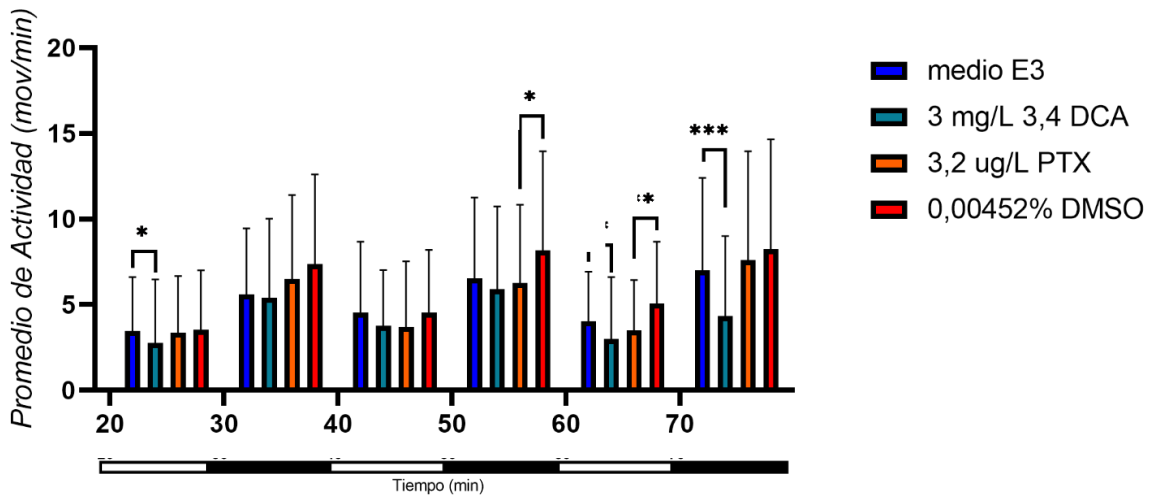
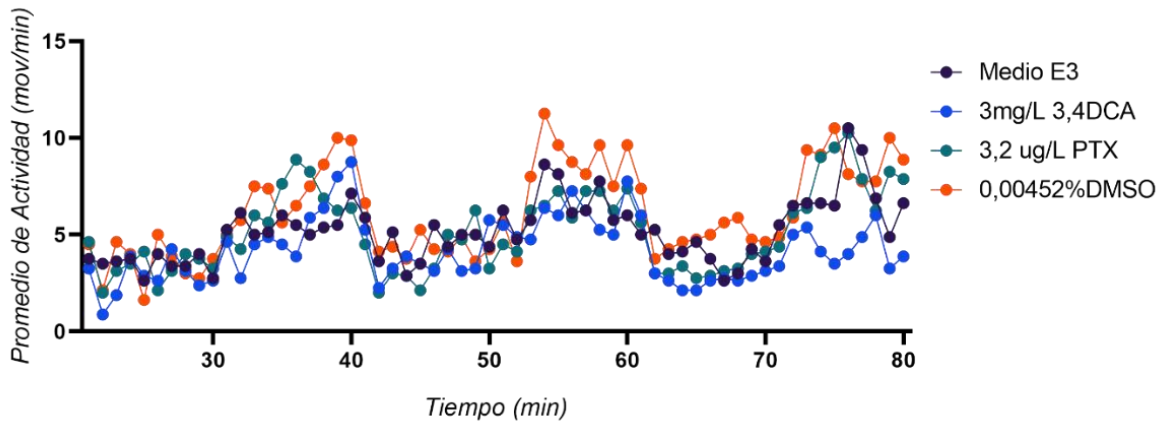


Figura 15. a) Ciclo de actividad promedio en embriones de *Danio rerio*. b) Promedio de actividad de embriones de *Danio rerio* expuestas a Medio E3 (control negativo), 3mg/L 3,4 DCA, 0,80 ug/L, 1,6 ug/L 3,2 ug/L PTX, durante 80 minutos. Los datos se expresan como el promedio de 8 réplicas (n=1).

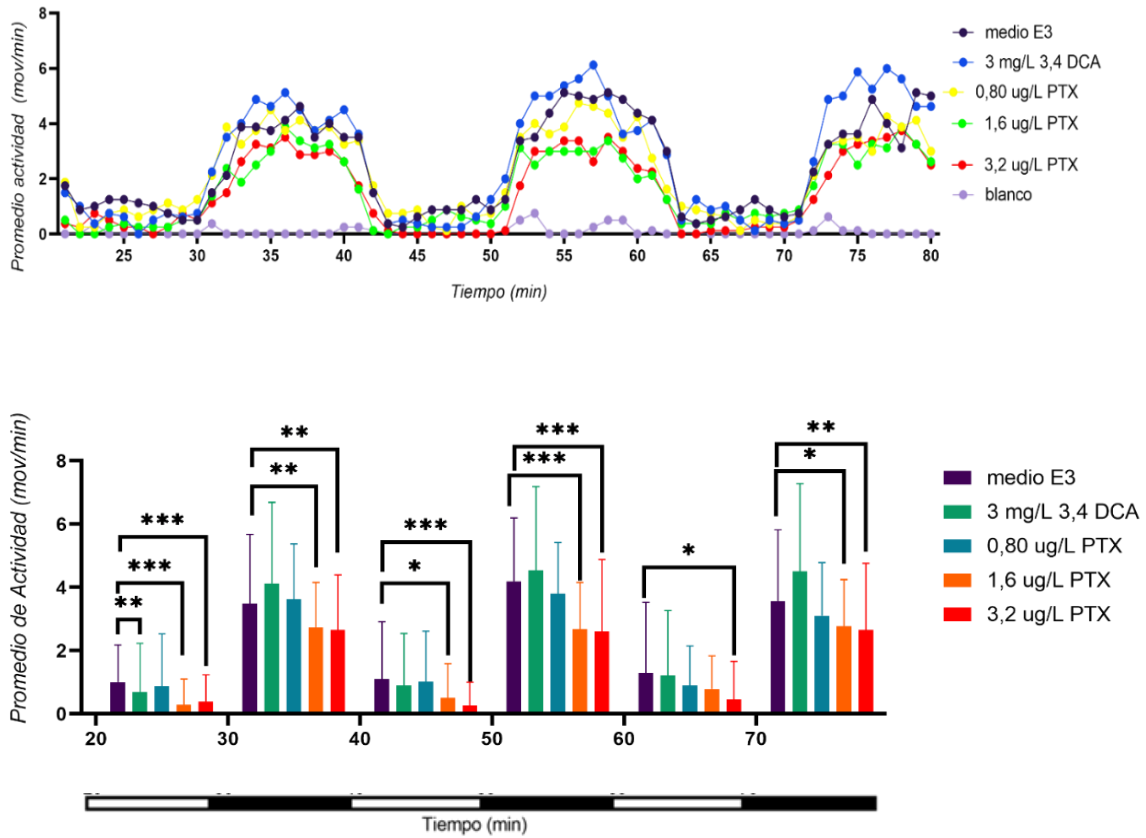


Figura 16. Promedio de actividad locomotora de larvas de *Danio rerio*. expuestas a medio E3 (control negativo), 3mg/L 3,4 DCA, 0,80 ug/L, 1,6 ug/L 3,2 ug/L PTX, durante 80 minutos. Los datos se expresan como el promedio de 8 réplicas (n=1).

Discusión

El principal objetivo de este estudio fue la evaluación del efecto sobre el desarrollo embrionario y larval del pez cebra (*Danio rerio*) de la exposición por inmersión a la biotoxina lipofílica pectenotoxina en concentraciones presentes en las costas chilenas, durante un evento de floraciones algales nocivas (FANs). Para esto se evaluó de forma separada ambas etapas de desarrollo, estudiando la supervivencia, parámetros asociados al crecimiento, actividad locomotora y neurotoxicidad.

En embriones expuestos a concentraciones de 0,80 µg/L, 1,6 µg/L y 3,2 µg/L de PTX se evaluó la supervivencia y la eclosión. Los primeros resultados no fueron concluyentes debido a una inadecuada selección de los huevos, ya que se emplearon huevos no fecundados que posteriormente se coagularon. Esta experiencia destaca la importancia de conocer bien el modelo de ensayo para evitar la pérdida de material y tiempo. Al repetir los ensayos, los resultados fueron contrarios a lo esperado ya que las concentraciones de 0,80, 1,6 y 3,2 µg/L de PTX no produjeron mortalidad ni retraso en la eclosión. Para este resultado existen dos posibles explicaciones; la primera es que la toxina no atravesó el corion, y la segunda, que las concentraciones de la toxina eran demasiado bajas para tener algún efecto significativo. El corion es una estructura que ofrece protección y actúa como la primera barrera contra microorganismos, toxinas y otros estresores ambientales durante el desarrollo embrionario del pez cebra, lo que puede influir en los estudios de toxicidad embrionaria (Tran et al., 2021). En este estudio, se decidió no remover el corion, ya que el objetivo principal era recrear escenarios ecológicamente relevantes. Sin embargo, los resultados sugieren que la toxina sí logra atravesar el corion, dado que, al analizar las medidas morfométricas, los individuos expuestos a PTX durante el periodo del desarrollo embrionario, mostraron un mayor tamaño del saco vitelino en comparación con los demás, indicando un posible efecto en la absorción del saco vitelino. Por otra parte, no se observaron malformaciones en las larvas recién eclosionadas, lo cual podría atribuirse a la baja concentración de la toxina. En estudios similares con otras toxinas lipofílicas, como el ácido okadaico, se han registrado alteraciones como edemas y curvaturas de cola a concentraciones entre 1 y 15 µg/mL (Figuerola et al., 2020). Las medidas morfométricas son indicadores altamente sensibles a la exposición a sustancias tóxicas (Dong et al., 2023) y son especialmente útiles en estudios de nanotoxicidad, como en el caso de nTiO₂ (Samaee et al., 2018).

El siguiente objetivo de este estudio fue cuantificar la mortalidad y malformaciones en larvas de pez cebra expuestas desde la eclosión hasta la absorción del vitelo a la PTX. Los resultados obtenidos indicaron que no hubo mortalidad ni malformaciones en las larvas expuestas, lo que podría deberse a

que las concentraciones utilizadas fueron demasiado bajas para generar estos efectos. Esto concuerda con los hallazgos de Gaillard et al. (2023), quienes expusieron larvas de pez oveja de tres semanas de edad a distintas concentraciones de PTX por inmersión durante 96 horas. En su estudio, la mortalidad solo ocurrió a concentraciones superiores a 214,75 $\mu\text{g/L}$ de PTX, una cantidad casi 60 veces mayor que la utilizada en este estudio. Según Gaillard et al. (2023), sus resultados pueden deberse al mecanismo de acción de la PTX, la cual inhibe la polimerización de la actina (Hori et al 1999), una proteína presente en las células de pilastra (Bettex Galland y Hughes, 1973) que se encuentran en las láminas branquiales secundarias, y que desempeña un papel clave en el intercambio gaseoso, lo que podría llevar a insuficiencia respiratoria y posterior muerte.

Debido al aumento de las concentraciones de gases de efecto invernadero por actividades antropogénicas, se prevé que uno de los efectos de los cambios producidos será la alteración en la frecuencia, duración y distribución geográfica de las floraciones algales nocivas (Moore et al., 2008). Esto podría conducir a concentraciones más altas de PTX en el medio marino, representando un riesgo para las poblaciones marinas, ya que se ha demostrado que concentraciones entre 4,3 y 42,95 $\mu\text{g/L}$ afectan el éxito en la fertilización entre ovocitos y espermatozoides (Gaillard et al., 2020). En otros estudios en moluscos, se ha observado que una concentración también alta de 179 $\mu\text{g/L}$ PTX2 (equivalente a 10.000 células *Dinophysis*/mL) induce una mortalidad de al menos el 50% en larvas de 7 días de edad de la ostra *Crassostrea virginica* (Pease et al., 2022). Considerando esto, es posible que, en el futuro a concentraciones más altas de PTX, existan consecuencias significativas para las poblaciones naturales.

En la evaluación de la actividad locomotora de las larvas, que es un indicador del estado de condición de un organismo, se observó que las larvas expuestas a las concentraciones de PTX (sin uso de DMSO) presentaban una menor actividad locomotora en comparación con el control negativo. Este resultado podría estar relacionado al estrés inducido por la exposición a esta toxina o quizás asociado al mecanismo de acción de la toxina que, como se mencionó anteriormente, la PTX inhibe la polimerización de la actina (Hori et al., 1999). En este caso, dicha proteína se puede encontrar en la musculatura, ya que interviene en la contracción muscular cuando se conecta con la miosina (Remedios et al., 2003), por lo que se podría sugerir que la toxina podría estar afectando dicha unión.

En este estudio se evaluó también la posible neurotoxicidad inducida por la PTX en embriones y larvas. Para el caso de los embriones se utilizó la prueba de enrollamiento de cola siguiendo el protocolo de De Oliveira et al. (2021), que indica que entre las 22 y 29 horas post-fecundación los

embriones presentan una actividad constante de enrollamiento. Los resultados de esta evaluación no fueron concluyentes, ya que los embriones expuestos al control solvente mostraron una mayor actividad en comparación con los demás tratamientos. Aunque varios estudios sugieren que el DMSO es un buen solvente orgánico para bioensayos a concentraciones menores al 1% (Maes et al., 2012; De Oliveira et al., 2021), los resultados de este estudio no coinciden con estas conclusiones, puesto que se determinaron alteraciones bajo los porcentajes indicados como seguros a utilizar. Por lo tanto, los resultados de presente estudio, indican que posiblemente este solvente en las concentraciones utilizadas induce un daño neurotóxico y no permite evaluar el efecto de la toxina propiamente tal.

Por otra parte, para evaluar la neurotoxicidad en larvas, se expuso a larvas de pez cebra de 3 dpf (recién eclosionadas) a 0,80 ug/L, 1,6 ug/L y 3,2 ug/L de PTX durante 48h. Los resultados obtenidos post exposición a la toxina indica que existen alteraciones en los patrones de respuesta a los cambios de luz/Oscuridad en los tratamientos 1,6 ug/L y 3,2 ug/L. Esta respuesta podría ser modulada por el mecanismo de acción de la PTX, la cual podría estar alterando la neurogénesis. Si bien no existen otros estudios que detallen el efecto de la PTX específicamente en la neurogénesis, existen estudios como el de Dou & Zhang (2011) quienes investigaron el efecto neurotóxico del Pb en pez cebra, encontrando que la neurotoxicidad inducida puede ser por una neurogénesis alterada mediante un aumento de la apoptosis en las células neuronales y gliales. Si bien aún no se sabe el efecto de la PTX en la neurogénesis, ésta mediante su mecanismo de acción molecular, podría tener efectos neurodegenerativos, debido a su acción en la inhibición de la polimerización de la actina. Esta proteína es importante durante el proceso de división de las células animales, ya que participa en la citocinesis, en la creación del anillo contráctil (Zalacain et al., 2005) por lo que se sugiere que la inhibición de la polimerización podría afectar la génesis de nuevas neuronas.

Hasta ahora, este es el primer estudio que demuestra la neurotoxicidad en larvas de peces expuestos a pectenotoxina, sin embargo, hay estudios en otras toxinas lipofílicas como el Ácido Okadaico, en donde se demuestra que esta sustancia a 0,1 ng/ml en larvas de 5dpf de pez cebra (*Danio rerio*), reduce la actividad locomotora en relación con el control negativo (Yañez-Bailey, 2022). Esto coincide con nuestros resultados, en donde se alteran los patrones de respuesta a los cambios de luz/oscuridad en los tratamientos con 1,6 ug/L y 3,2 ug/L de PTX, teniendo así un efecto dosis dependiente.

Conclusiones

1. La pectenotoxina en las concentraciones ensayadas no induce mortalidad embrionaria, malformaciones ni alteraciones del desarrollo embrionario tales como longitud total, área de capsula ótica a excepción del área de saco vitelino y área de ojo.
2. No hubo evidencias de alteraciones en la actividad locomotora ni de neurotoxicidad en embriones inducidas por las concentraciones ensayadas.
3. El DMSO como solvente no es apto para ensayos de neurotoxicidad embrionaria puesto que se ven alteraciones incluso en concentraciones bajo el 1%.
4. La pectenotoxina en las concentraciones ensayadas no induce mortalidad larval, malformaciones ni alteraciones del desarrollo como longitud total, área de ojo ni área de capsula ótica.
5. La pectenotoxina a concentraciones entre 0,80ug/L-3,2ug/L induce una disminución de la actividad locomotora en larvas de 3 dpf. Además, provoca neurotoxicidad a concentraciones entre los 1,6ug/L-3,2ug/L mediante alteraciones en el comportamiento locomotor frente a transiciones de luz/oscuridad.
6. Se rechaza la primera hipótesis planteada debido a que los resultados no son concluyentes, por lo que no se puede asegurar que existe una alteración significativa en el desarrollo embrionario del pez cebra. Se acepta la segunda hipótesis planteada ya que existe una alteración en el desarrollo larval del pez cebra mediante alteraciones en la actividad locomotora y efectos neurotóxicos.

Referencias bibliográficas

- Alves-de-Souza, C., Varela, D., Contreras, C., De La Iglesia, P., Fernández, P. A., Hipp, B., Hernández, C., Riobó, P., Reguera, B., Franco, J. M., Diogène, J., García, C., & Lagos, N. (2014). Seasonal variability of *Dinophysis* spp. and *Protoceratium reticulatum* associated to lipophilic shellfish toxins in a strongly stratified Chilean fjord. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 101, 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.01.014>
- Assunção, J., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2017). Biotechnological and pharmacological applications of biotoxins and other bioactive molecules from dinoflagellates. *Marine Drugs*, 15(12), 393. <https://doi.org/10.3390/md15120393>
- Baldrich, Á. M., Pérez-Santos, I., Álvarez, G., Reguera, B., Fernández-Pena, C., Rodríguez-Villegas, C., Araya, M., Álvarez, F., Barrera, F., Karasiewicz, S., & Díaz, P. A. (2021). Niche differentiation of *dinophysis acuta* and *D. acuminata* in a stratified fjord. *Harmful Algae*, 103, 102010. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102010>
- Barrio, D. A., Avila Maniero, A. A., Piñuel, M. L., Solimano, P. J., Boeri, P. A., Zubillaga, M. F., & Cantoni, G. E. (2015). El pez cebra (*Danio rerio*) como un sistema modelo para la valoración biológica de las toxinas producidas por la marea roja.
- Beekhuijzen, M., De Koning, C., Flores-Guillén, M., De Vries-Buitenweg, S., Tobor Kaplon, M., Van De Waart, B. & Emmen, H. (2015). From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reprod. Toxicol.*, 56, 64-7
- Berry, J. E., 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: Toxicology & Pharmacology*, 145(1), 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.07.011>
- Blanco, J., Álvarez, G., & Uribe, E. (2007). Identification of pectenotoxins in plankton, filter feeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. *Toxicon*, 49(5), 710-716. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.013>
- Cortes, R. (1998). *Las mareas rojas* (Primera edición) A.G.T. Editor, S.A.
- Costa, S. T., Rudnitskaya, A., Vale, C., Guilhermino, L., & Botelho, M. J. (2020). Sorption of 48 okadaic acid lipophilic toxin onto plastics in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 157(May), 111322. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111322>
- De Oliveira, A., Brigante, T., & Oliveira, D. (2021). Tail Coiling Assay in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos: Stage of Development, Promising Positive Control Candidates, and Selection of an Appropriate Organic Solvent for Screening of Developmental Neurotoxicity (DNT). *Water*, 13(2), 119. <https://doi.org/10.3390/w13020119>
- Díaz, P. A., Álvarez, G., Pizarro, G., Blanco, J., & Reguera, B. (2022). Lipophilic Toxins in Chile: history, producers and impacts. *Marine Drugs*, 20(2), 122. <https://doi.org/10.3390/md20020122>
- Díaz, P. A., Álvarez, G., Seguel, M., Marín, A., & Krock, B. (2020). First detection of pectenotoxin-2 in shellfish associated with an intense spring bloom of *Dinophysis acuminata* on the central Chilean coast. *Marine Pollution Bulletin*, 158, 111414. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111414>
- Díaz, P. A., Álvarez, G., Varela, D., Pérez-Santos, I., Díaz, M., Molinet, C., Seguel, M., Aguilera-Belmonte, A., Guzmán, L., Uribe, E., Rengel, J., Hernández, C., Segura, C. J., & Figueroa, R. I. (2019). Impacts of harmful algal blooms on the aquaculture industry: Chile as a case study. *Perspectives in phycology*, 6(1-2), 39-50. <https://doi.org/10.1127/pip/2019/0081>

- Díaz, P. A., Pérez-Santos, I., Álvarez, G., Garreaud, R., Pinilla, E., Díaz, M., Sandoval, A., Araya, M., Álvarez, F., Rengel, J., Montero, P., Pizarro, G., López, L., Iriarte, L., Igor, G., & Reguera, B. (2021). Multiscale physical background to an exceptional harmful algal bloom of *Dinophysis acuta* in a fjord system. *The Science of the Total Environment*, 773(145621), 145621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145621>
- Domínguez, H. J., Paz, B., Daranas, A. H., Norte, M., Franco, J. M., & Fernández, J. J. (2010). Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicon*, 56(2), 191-217. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.005>
- Dong, G., Wang, N., Xu, T., Liang, J., Qiao, R., Yin, D., & Lin, S. (2023). Deep Learning-Enabled Morphometric Analysis for Toxicity Screening Using Zebrafish Larvae. *Environmental Science & Technology*, 57(46), 18127-18138. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00593>
- Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., & Poletti, R. (1996). First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon*, 34(8), 923-935. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00030-x](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00030-x)
- FAO. 2004. Marine Biotoxins. En: FAO Food and Nutrition Paper. Roma
- Fellenz, N., Piñuel, L., Boeri, P., Fernández, C., & Barrio, N. (2014). Desarrollo De Un Nuevo Bioensayo Para Detección De Toxinas Marinas En Moluscos Bivalvos Utilizando El Modelo Del Pez Cebra (*Danio rerio*). 39–43
- Gaillard, S., Goïc, N. L., Malo, F., Boulais, M., Fabioux, C., Zaccagnini, L. L., Carpentier, L., Sibat, M. M., Réveillon, D., Sechet, V., Hess, P., & Hegaret, H. (2020). Cultures of *Dinophysis sacculus*, *D. acuminata* and pectenotoxin 2 affect gametes and fertilization success of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution*, 265, 114840. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114840>
- Gaillard, S., Réveillon, D., Mason, P. L., Ayache, N., Sanderson, M. P., Smith, J. L., Giddings, S. D., McCarron, P., Sechet, V., Hégaret, H., Heß, P., & Vogelbein, W. K. (2023). Mortality and histopathology in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larvae exposed to pectenotoxin-2 and *Dinophysis acuminata*. *Aquatic Toxicology*, 257, 106456. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106456>
- Gomariz, M. V. B., Fructuoso, M. C., & Rodríguez, S. S. F. (1994). Toxicidad de cuatro solventes orgánicos sobre tres estadios de desarrollo larvario de *Artemia salina*. *Revista de toxicología*, 11(2), 92-95.
- Hill, A., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6-19. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>
- Hori, M., Matsuura, Y., Yoshimoto, R., Ozaki, H., Yasumoto, T., & Karaki, H. (1999). Actin depolymerizing action by marine toxin, pectenotoxin-2. *Nihon Yakurigaku zasshi. Folia Pharmacologica Japonica*, 114, 225P-229P.
- Kim, G., Kim, W., & Jeon, Y. (2011). Pectenotoxin-2 from Marine sponges: A potential Anti-Cancer Agent—A Review. *Marine Drugs*, 9(11), 2176-2187. <https://doi.org/10.3390/md9112176>
- Krock, B., Seguel, C. G., Valderrama, K., & Tillmann, U. (2009). Pectenotoxins and yessotoxin from Arica Bay, North Chile as determined by tandem mass spectrometry. *Toxicon*, 54(3), 364-367. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.04.013>
- MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Suzuki, T., & Selwood, A. (2005). Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae*, 4(1), 75-85.
- Maes, J., Verlooy, L., Buenafe, O. E., De Witte, P. A. M., Esguerra, C. V., & Crawford, A. D. (2012). Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. *PloS One*, 7(10), e43850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043850>

- Moon, D., Kim, M., Kang, S., Lee, K., Heo, M., Choi, K., Choi, Y. H., & Kim, G. (2008). Induction of G2/M arrest, endoreduplication, and apoptosis by Actin depolymerization agent pectenotoxin-2 in human leukemia cells, involving activation of ERK and JNK. *Biochemical Pharmacology*, 76(3), 312-321. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.006>
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET)
- Pease, S. K., Brosnahan, M. L., Sanderson, M. P., & Smith, J. L. (2022). Effects of two Toxin-Producing harmful algae, *Alexandrium catenella* and *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae), on activity and mortality of larval shellfish. *Toxins*, 14(5), 335. <https://doi.org/10.3390/toxins14050335>
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P. A., Pizarro, G., Paz, B., Franco, J. M., & Blanco, J. (2014). *Dinophysis* Toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine Drugs*, 12(1), 394-461. <https://doi.org/10.3390/md12010394>
- Rico, E. P., Rosemberg, D. B., Senger, M. R., De Bem Arizi, M., Bernardi, G. F., Dias, R. D., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2006). Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicology And Teratology*, 28(4), 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2006.05.001>
- Saint-Amant, L., & Drapeau, P. (1998). Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *Journal Of Neurobiology*, 37(4), 622-632. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4695\(199812\)37:4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(199812)37:4)
- Samaee, S., Manteghi, N., Yokel, R. A., & Mohajeri-Tehrani, M. R. (2018). Morphometric characteristics and time to hatch as efficacious indicators for potential nanotoxicity assay in zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(12), 3063-3076. <https://doi.org/10.1002/etc.4266>
- Sandoval, M. S., Parada, C., & Torres, R. (2018). Proposal of an Integrated System for Forecasting Harmful Algal Blooms (HAB) in Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(2), 424-451. <https://doi.org/10.3856/vol46-issue2-fulltext-18>
- Sellner, K. G., Doucette, G. J., & Kirkpatrick, G. J. (2003). Harmful algal blooms: Causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30(7), 383-406. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0074-9>
- Shin, IJ; Ahn, YT; Kim, Y.; Kim, JM; An, WG Los agentes disruptores de actina inducen la fosforilación de la histona H2AX en células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano. *Oncol. Representante* 2011 , 25 , 1313-1319.
- Spector, I., Braet, F., Shochet, N. R., & Bubb, M. R. (1999). New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy research and technique*, 47(1), 18-37.
- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., & Zhou, Z. (2019). The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*, 9(3), 68-77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- Tran, C. M., Lee, H., Lee, B., Ra, J., & Kim, K. (2021). Effects of the chorion on the developmental toxicity of organophosphate esters in zebrafish embryos. *Journal Of Hazardous Materials*, 401, 123389. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123389>
- Vargas, R. A., Sarmiento, K., & Vásquez, I. C. (2015a). Zebrafish (*Danio rerio*): A Potential Model for Toxinological Studies. *Zebrafish*, 12(5), 320-326. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1102>
- Zalacain, M., Sierrasesumaga, L., & Patiño, A. (2005, August). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. In *Anales del sistema sanitario de Navarra* (Vol. 28, No. 2, pp. 227-236). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.