

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Doctorado en Ciencias  
en Ecología Marina**

---

**Efectos neurotóxicos subletales en totoaba (*Totoaba  
macdonaldi*) y lobina rayada (*Morone saxatilis*) por alimento  
contaminado con ácido domoico**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias

Presenta:

**Kassandra Beltrán Solís**

Ensenada, Baja California, México  
2025

Tesis defendida por  
**Kassandra Beltrán Solís**

y aprobada por el siguiente Comité

**Dr. Jorge Adrián Rosales Casián**  
Co-Director de tesis

**Dra. Lus Mercedes López Acuña**  
Co-Directora de tesis

**Dr. Miguel Cuevas Cruz**

**Dr. Juan Pablo Lazo Corvera**

**Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza**



**Dr. Rafael Andrés Cabral Tena**  
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Kassandra Beltrán Solís** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctora en Ciencias en Ecología Marina.

**Efectos neurotóxicos subletales en totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y lobina rayada (*Morone saxatilis*) por alimento contaminado con ácido domoico**

Resumen aprobado por:

**Dr. Jorge Adrián Rosales Casián**  
Co-Director de tesis

**Dra. Lus Mercedes López Acuña**  
Co-Directora de tesis

El ácido domoico (AD) es una neurotoxina potente producida por diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*, esta toxina ha ocasionado daños en aves, mamíferos y otros vertebrados marinos e incluso también a humanos. Sin embargo, en peces no se han detectado afectaciones neuroconductuales cuando están expuestos naturalmente al AD, sino únicamente cuando este se administra de manera intraperitoneal. Por lo tanto, la idea inicial es que los peces son menos sensibles al AD adquirido a través de rutas relevantes de exposición ecológicamente. En el presente trabajo se demuestra que el consumo de alimentos con AD induce alteraciones neuroconductuales e histopatológicas en el cerebro y el corazón de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y de la lobina rayada (*Morone saxatilis*). En el presente estudio se identificaron lesiones en el lóbulo óptico y el cerebelo en ambas especies después de siete días de exposición a una dieta con una concentración de  $0.776 \mu\text{g}$  de DA  $\text{g}^{-1}$  y estas persistieron en el tiempo. Asimismo, observamos que el tejido cardíaco presentaba lesiones y melanismo focal en el atrio. Aunque las afectaciones en los tejidos cerebral y cardíaco fueron evidentes, no se observaron signos excitotóxicos como los descritos en la literatura en otros vertebrados. Sin embargo, se detectó disminución en las respuestas conductuales en las pruebas luz/oscuridad y antidepredador durante la exposición al AD. Las alteraciones conductuales y patológicas posiblemente ocasionen efectos relevantes.

**Palabras clave:** Biotoxina, neurotoxicidad, histopatología, neuroetología, peces marinos.

Abstract of the thesis presented by **Kassandra Beltran Solis** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Marine Ecology.

**Sublethal neurotoxic effects in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) and striped bass (*Morone saxatilis*) by food contaminated with domoic acid**

Abstract approved by:

**Dr. Jorge Adrián Rosales Casián**

Co-Director de tesis

**Dra. Lus Mercedes López Acuña**

Co-Directora de tesis

Domoic acid (DA) is a potent neurotoxin produced by diatoms of the genus *Pseudo-nitzschia*. This toxin has caused damage in birds, mammals, and other marine vertebrates, as well as in humans. However, no neurobehavioral effects have been detected in fish when they are naturally exposed to DA, but only when it is administered intraperitoneally. Therefore, the initial idea is that fish are less sensitive to DA acquired through ecologically relevant routes of exposure. The present work demonstrates that consumption of food containing DA induces neurobehavioral and histopathological alterations in the brain and heart of totoaba (*Totoaba macdonaldi*) and striped bass (*Morone saxatilis*). In the present study, lesions in the optic lobe and cerebellum were identified after seven days of exposure to a diet with a concentration of 0.776  $\mu\text{g}$  de DA  $\text{g}^{-1}$  and these persisted over time. We also observed that cardiac tissue showed lesions and focal melanism in the atrium. Although the effects in brain and cardiac tissues were evident, no excitotoxic signs were observed as described in the literature for other vertebrates. However, decreased behavioral responses in light/dark and anti-predator tests were detected during DA exposure. Behavioral and pathological alterations are likely to cause relevant effects.

**Keywords:** biotoxin, neurotoxicity, histopathology, neuroethology, marine fish.

## **Dedicatoria**

Para E.

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). En especial al programa de posgrado de Ecología Marina.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por el apoyo económico otorgado (906063).

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), especialmente a la Facultad de Ciencias Marinas (FCM), a la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) y al laboratorio de histología de la Facultad de Ciencias.

A los laboratorios FTX y BA, a toda su gente por el apoyo, paciencia y compañía.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas .....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	3
1.1.1 Mecanismo de acción del ácido domoico .....	3
1.1.2 Efecto del ácido domoico en tejidos .....	4
1.1.3 Efectos conductuales.....	5
1.1.4 Efecto del ácido domoico en peces.....	6
1.2 Justificación .....	9
1.3 Hipótesis.....	9
1.4 Objetivos .....	10
1.4.1 Objetivo general.....	10
1.4.2 Objetivos específicos.....	10
<b>Capítulo 2. Metodología .....</b>	<b>11</b>
2.1 Ensayo de ingesta de alimento fresco con ácido domoico en <i>Totoaba macdonaldi</i> y <i>Morone saxatilis</i> .....	11
2.1.1 Organismos de <i>Totoaba macdonaldi</i> y <i>Morone saxatilis</i> .....	11
2.1.2 Preparación de dietas.....	11
2.1.3 Análisis de dietas por HPLC .....	12
2.1.4 Bioensayo de alimentación .....	12
2.1.5 Pruebas conductuales .....	13

2.1.5.1	Prueba de aprendizaje conductual en <i>Morone saxatilis</i> .....	13
2.1.5.2	Prueba de luz/oscuridad en <i>Totoaba macdonaldi</i> .....	14
2.1.5.3	Prueba de conducta antidepredador en <i>Totoaba macdonaldi</i> .....	16
2.1.5.4	Análisis de videos de pruebas conductuales .....	17
2.1.6	Muestreo de organismos: eutanasia y disección .....	18
2.1.7	Análisis histológico .....	18
2.1.8	Análisis estadístico .....	19
2.1.8.1	Análisis Probit .....	19
2.2	Evaluación de morfología cerebral en <i>Totoaba macdonaldi</i> .....	20
2.2.1	Mantenimiento de organismos .....	20
2.2.2	Eutanasia y disección .....	20
2.2.3	Cortes seriados .....	21
2.2.4	Procesamiento de imágenes .....	21
2.3	Evaluación del efecto del ácido domoico en alimento balanceado en un modelo mamífero .....	22
2.3.1	Mantenimiento de organismos .....	22
2.3.2	Preparación de harina de pescado .....	22
2.3.3	Dietas experimentales .....	23
2.3.4	Diseño experimental .....	23
2.3.5	Eutanasia y disección .....	24
2.3.6	Cuantificación de ácido domoico mediante HPLC-MS/MS .....	24
2.3.7	Análisis histológico .....	24
2.4	Permanencia del ácido domoico en diferentes condiciones de preparación de harina de pescado .....	25
2.4.1	Preparación de harina de pescado .....	25
2.4.2	Pruebas de permanencia con antioxidantes .....	25
2.4.2.1	Tratamiento 1 .....	25
2.4.2.2	Tratamiento 2 .....	25

<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>	<b>27</b>
3.1 Ensayo de ingesta de alimento fresco con ácido domoico en <i>Totoaba macdonaldi</i> y <i>Morone saxatilis</i> .....	27
3.1.1 Contenido de ácido domoico en dietas.....	27
3.1.2 Efecto del AD en <i>Totoaba macdonaldi</i> y <i>Morone saxatilis</i> .....	27
3.1.2.1 Peso de organismos.....	27
3.1.2.2 Daño en tejido cerebral y cardíaco en totoaba y lobina rayada .....	28
3.1.3 Pruebas conductuales .....	30
3.1.3.1 Prueba de aprendizaje conductual en <i>Morone saxatilis</i> .....	30
3.1.3.2 Prueba de luz/oscuridad .....	31
3.1.3.3 Prueba de conducta antidepredador .....	31
3.2 Evaluación de morfología cerebral en <i>Totoaba macdonaldi</i> .....	34
3.2.1 Organismo sano.....	34
3.2.2 Peces expuestos al ácido domoico en alimento .....	36
3.3 Evaluación del efecto del alimento balanceado con ácido domoico en un modelo mamífero .....	39
3.3.1 Comportamiento.....	39
3.3.2 Contenido de ácido domoico en harinas de pescado .....	39
3.3.3 Contenido de ácido domoico en órganos de ratón.....	40
3.3.4 Análisis histológico .....	40
3.4 Permanencia del ácido domoico (AD) en diferentes preparaciones de harina de pescado .	41
3.4.1 Concentración de ácido domoico en harinas de pescado.....	41
<b>Capítulo 4. Discusión .....</b>	<b>42</b>
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>	<b>47</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>48</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>53</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Montaje de prueba conductual de aprendizaje. Se indica con etiqueta roja los organismos previamente expuestos a la dieta experimental con alta concentración de AD (Dieta-HC). Con etiqueta azul los organismos previamente expuestos a la dieta control con baja concentración de AD(Dieta-LC). Organismos con etiqueta roja fueron transferidos al acuario que recibe dieta-HC y viceversa. ....	13
2. Acuario para prueba de luz/oscuridad (escototaxis). El acuario se divide en una sección oscura (paredes cubiertas con papel negro) y una sección clara (paredes sin cubrir). En la parte media del acuario hay un compartimento de intersección delimitado con puertas móviles donde el organismo es colocado para su habituación previo al inicio de la prueba. ....	16
3. Acuario para prueba antidepredador. La prueba se realiza en el mismo acuario que la prueba de luz/oscuridad. Se indica la manera en que el modelo de silicón del depredador es ingresado al acuario. ....	17
4. Reflejo de arranque en C (C-start reflex). Flexión del pedúnculo caudal en peces como técnica de escape. ....	17
5. Técnica histológica de cortes seriados. 1) Extracción de cerebro completo 2) Cerebro en casete de histología 3) Deshidratación e inclusión en parafina 4) Obtención de cortes con microtomo 5) Obtención de cortes transversales seriados del cerebro 6) Preparación y montaje de laminillas 7) Obtención de imágenes de secciones transversales del cerebro 8) Identificación de regiones afectadas por el AD. ....	21
6. Diseño experimental de tratamientos para evaluación de permanencia del ácido domoico durante la elaboración de harina de pescado. Tratamiento 1 con eliminación de licor de prensa y tratamiento 2 secado directo del material cocido sin paso de eliminación de licor de prensa. Para ambos tratamientos se realizó un subtratamiento de añadir antioxidante (BHT) al producto final. ....	26
7. Daño en tejido cerebral y cardiaco de <i>Totoaba macdonaldi</i> después del consumo de AD en alimento. Lóbulo óptico (OT) (1), cerebelo (5) y, corazón (9) sin daño tisular en el día 0. OT (2) son pérdida de neuropilo y neuronas con necrosis oncótica (círculo), vacuolización de células de Purkinje en cerebelo (6), corazón (10) con melanismo atrial y ventrículo (V) sin alteraciones después de 7 días de iniciar el consumo de AD. Al día 14, el OT presentó gránulos de melanina en la parte externa de las células neuronales (flechas) y pérdida de neuropilo (3), el cerebelo presentó vacuolización de las células de Purkinje (7) el corazón presentó acumulación de núcleos celulares en la periferia del ventrículo y separación entre fibras musculares (11). Al día 60, las neuronas del OT presentaron gránulos citoplasmáticos (centro de la imagen) y pérdida de neuropilo (4). El cerebelo presentó vacuolización de las células de Purkinje (8) y el corazón mostró melanismo en los atrios izquierdo y derecho (12). ....	29

8. Daño en tejido de *Morone saxatilis*. 1) OT día 0. Tejido sin alteraciones. 2) OT día 7. Neurona con núcleo condensado (picnosis) (flechas). Neurona con núcleo fragmentado (karyorhexys) (círculo). Necrosis licuefactiva caracterizada por cambio esponjiforme del neuropilo (rectángulo). 3) OT día 14. Necrosis licuefactiva. Neuronas con karyorhexys (flechas). Neurona con núcleo condensado (círculo) 4) OT día 90. Neuronas en diferentes niveles de necrosis oncótica (círculo) 5) CER día 0. ML=capa molecular. PCL= capa de células de Purkinje. GL=capa granular. 6, 7, 8) Vacuolización en capa de células de Purkinje (flechas). 9) HT día 0. Fibras musculares normales. 10) HT día 7. Edema intersticial en miocardio. 11) HT día 14. Necrosis en cardiomiocitos (círculo). 12) HT día 90. Melanismo atrial. Hematoxilina-eosina..... 30
  
9. Indicadores conductuales de *Totoaba macdonaldi* alimentada con AD (círculos azules) e individuos sanos (círculos blancos). A) Tiempo de permanencia en el lado blanco del acuario de prueba. b) Número de eventos de congelamiento. c) Tiempo de conducta exploratoria. d) Tiempo de respuesta de escape ante un depredador hipotético. El cambio (en unidades relativas; r.u.) de cada indicador conductual se evaluó comparando la respuesta de los individuos en cada tiempo de muestreo con la respuesta medida el día 0 (previo al inicio de la ingesta de AD). El promedio y error estándar (n=7) es indicado. \* Representa una diferencia significativa en el indicador conductual de individuos que consumieron AD en cada tiempo de muestreo comparado con la respuesta de individuos sanos..... 32
  
10. Relación entre tratamiento con AD y respuesta conductual (Probit). Correlación entre el tiempo de consumo de dieta-HC (días) y el probit del tiempo de escape frente a un depredador hipotético. La línea punteada (verde) indica el valor máximo observado (E<sub>max</sub>=1.02), correspondiente a un 84% de respuesta acumulada..... 33
  
11. Secciones transversales del cerebro sano de juvenil de *Totoaba macdonaldi* (a). La vista lateral representa el plano general del cerebro de un teleósteo y se indica la posición de las secciones transversales mostrada en el panel (b). Las secciones transversales fueron etiquetadas arbitrariamente de la región cefálica a la región caudal del cerebro. .... 35
  
12. Comparación entre cerebro de individuos de *Totoaba macdonaldi* sanos e individuos de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dieta con ácido domoico (AD). La vista lateral representa el patrón general del cerebro de teleósteos y la localización de las secciones transversales presentadas del lado derecho de la figura se indica con números romanos. .... 37
  
13. Vista lateral del cerebro de *Totoaba macdonaldi* en tres individuos (a, b, c) expuestos al alimento con ácido domoico. Secciones transversales (1.I-III, 2.1-VIII, 3.I-XII). .... 38
  
14. Daño tisular en cerebro de ratón por consumo de alimento con ácido domoico. 1) Hipocampo 2) Giro dentado. Acercamiento a la región indicada con un rectángulo en panel 1. 3) Acercamiento a neuronas en el giro dentado. Neuronas son núcleo fragmentado (flechas) 4) Cerebelo 5) Detalle de capas del cerebelo GL: capa granular, PCL: capa de células de Purkinje, ML: capa molecular. Sin daño tisular. 6) Núcleo reticular del mesencéfalo (midbrain) con neuronas con morfología normal..... 40
  
15. Concentración de ácido domoico en harinas de pescado elaborados bajo dos tratamientos distintos..... 41

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Lesiones histopatológicas por exposición al AD en distintos grupos de vertebrados. ....	4
2. Signos conductuales de excitotoxicidad en diferentes especies de mamíferos. ....	7
3. Signos conductuales de excitotoxicidad en diferentes especies de peces. ....	8
4. Acido domoico (AD) en material crudo (sardina) utilizado para elaboración de harina de pescado. ....	23
5. Parámetros de crecimiento para juveniles de lobina rayada y totoaba alimentados con dietas con ácido domoico. ....	28
6. Valores transformados a escala Probit de la respuesta conductual en organismos tratados con ácido domoico (AD) y en el grupo control, en función del tiempo de tratamiento (días).....	33
7. Valores estándar de la función Probit.....	33
8. Concentración de ácido domoico ( $\mu\text{gDA g}^{-1}$ ) en harina de pescado y alimentos.....	39

## Capítulo 1. Introducción

---

El ácido domoico (AD) es una neurotoxina producida por varias especies de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* (Vieira et al., 2015) es un análogo estructural del L-glutamato (Silvagni et al., 2005), que es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso de vertebrados. Es conocido por afectar el sistema gastrointestinal, cardiaco y el sistema nervioso en aves y mamíferos marinos; a través de su unión con los receptores de glutamato presentes en el sistema nervioso y miocardio de vertebrados (McHuron et al., 2013; Zabaglo et al., 2016), y causa una sobre activación de estos receptores que ocasiona la muerte neuronal y signos neurotóxicos como confusión, desorientación, convulsiones, coma, e incluso la muerte (Pulido, 2008; Lefebvre et al., 2001).

Además de producir efectos excitotóxicos, el AD genera alteraciones histopatológicas en el sistema nervioso central de diferentes grupos de vertebrados (Lefebvre et al., 2010). Las intoxicaciones por AD han sido reportadas en humanos (Bates et al., 1989), aves (Fritz et al., 1992; Work et al., 1993; Sierra-Beltran et al., 1997) y mamíferos marinos piscívoros (Lefebvre et al., 2001; Fire et al., 2010) pero no se han sido reportadas en peces. Durante los florecimientos de especies productoras de AD, las especies de peces filtradoras (sardinas y anchovetas) son uno de los vectores principales de la toxina hacia niveles tróficos superiores debido a que pueden acumular concentraciones de hasta  $1175 \mu\text{g AD g}^{-1}$  (Lefebvre et al., 2001). Sin embargo, no existe evidencia de que los peces sean afectados por exposición natural al AD. Debido a esto, se creía que los peces no eran neurológicamente susceptibles al AD, esto probablemente asociado con un cambio en la estructura de los receptores de glutamato en el sistema nervioso que lo que les confería resistencia (Lefebvre et al., 2007). Sin embargo, se ha demostrado que el AD administrado intraperitonealmente (IP) afecta a los peces y el efecto neurológico es similar a lo caracterizado en otros modelos animales (Lefebvre et al., 2001; Lefebvre et al., 2007; Nogueira et al., 2009).

Por otra parte, no hay estudios sobre afectaciones del AD acumulado en el alimento de especies de peces por lo que se creía que esta toxina no representa un riesgo para la salud de estos organismos durante los florecimientos algales nocivos (FAN) de especies productoras (Hardy et al., 1995; Lefebvre et al., 2001; Lefebvre et al., 2007). Por lo tanto, la idea existente es que los peces

son tolerantes al AD en condiciones naturales de exposición (exposición durante FAN y adquisición por vía oral) o mucho más tolerantes que otros vertebrados (Lefebvre et al., 2012).

Después del trabajo de Lefebvre et al. (2012) la investigación del efecto del AD en peces ha sido escasa. Sin embargo, en experimentos recientes se documentó que la especie *Tototaba macdonaldi* es susceptible al AD administrado oralmente, ya que los organismos presentaron alteraciones tisulares importantes en cerebro y corazón (Beltrán-Solis, 2021). Aún cuando no se observaron signos conductuales de intoxicación con la dosis administrada en el periodo de observación, las alteraciones en el lóbulo óptico (cerebro) y en el corazón, indican que los organismos pueden eventualmente desarrollar afectaciones físicas que comprometan su desarrollo y supervivencia (Beltrán-Solis, 2021). Esto se acentuará si la exposición es continua y/o crónica y existe una acumulación del daño tisular.

Adicionalmente, los peces pelágicos menores (planctívoros) son utilizados en la elaboración de harina de pescado, que es uno de los principales componentes de los alimentos balanceados utilizados en la industria acuícola (Hardy et al., 1995). Dado que durante los florecimientos de especies productoras estos organismos pueden acumular altas concentraciones de AD, es concebible que el AD se encuentre en el suministro alimenticio de peces en cultivo a través de la harina de pescado y alimentos balanceados siempre que la toxina persista durante el proceso de manufactura (Hardy et al., 1995).

Durante la elaboración de harina de pescado no es común que se realicen análisis de presencia de toxinas en el material crudo o en el producto final, por lo que es posible que inadvertidamente se utilice material que contenga AD. Por lo tanto, la harina de pescado preparada a partir de pescados contaminados con la toxina representa un riesgo potencial para la industria acuícola y para la salud pública al ser una ruta no convencional de adquisición de la toxina. Lo anterior resalta la importancia de estudiar la permanencia y estabilidad del AD durante los procesos de elaboración de harina de pescado y alimento balanceado.

Por lo tanto, en el presente estudio se determinó el efecto del AD administrado a través del alimento en *Totoaba macdonaldi* (totoaba) y *Morone saxatilis* (lobina rayada), dos especies de peces de gran importancia para la industria acuícola en esta región de Baja California, así como también

se evaluó la presencia y persistencia del ácido domoico durante la elaboración de harina de pescado, así como sus efectos en un modelo mamífero.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Mecanismo de acción del ácido domoico

El AD es un aminoácido excitatorio análogo al glutamato, por lo que tiene gran afinidad por los receptores tipo ionotrópicos (NMDA, AMPA y kainato, con mayor afinidad por este último) de este neurotransmisor que se localizan en el cerebro y miocardio de vertebrados (Bargu et al., 2012; Todd, 1993; Zabaglo et al., 2016). El glutamato activa los receptores tipo NMDA de la terminal post-sináptica lo que genera un flujo de iones hacia el interior de la célula (Petroff et al., 2021). Cuando el DA atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) en los organismos y se une a la receptores tipo AMPA y receptores tipo kainato ocasiona la despolarización celular en la terminal pre-sináptica (Pulido, 2008) lo que desencadena una serie de eventos típicos de excitotoxicidad (Petroff et al., 2021).

La despolarización celular activa la liberación de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^+$  así como la liberación de vesículas de glutamato en la terminal sináptica (Lefebvre et al., 2009). El efecto neurotóxico del AD sobre el sistema nervioso central se manifiesta en signos como confusión, desorientación, convulsiones, coma, e incluso la muerte (Bargu et al., 2012; Lefebvre et al., 2001). Asimismo, el AD genera alteraciones tisulares como necrosis oncótica en regiones específicas del cerebro, degeneración neuronal en células de Purkinje y pérdida del neuropilo en el sistema nervioso central (Lefebvre et al., 2010; Pulido, 2008) (Tabla 1).

Estas alteraciones observadas en los diferentes grupos de vertebrados también están acompañadas por afectaciones en el tejido cardíaco ya que posee una cantidad significativa de receptores ionotrópicos de glutamato (Zabaglo et al., 2016) cuya activación ocasiona una cascada de eventos bioquímicos que llevan a lesiones celulares y tisulares (Pulido, 2008).

### 1.1.2 Efecto del ácido domoico en tejidos

Además de los impactos neuroconductuales inducidos por el AD, existe evidencia de que esta toxina genera efectos histopatológicos en el sistema nervioso central de vertebrados (Lefebvre et al., 2010) (Tabla 1). El daño tisular por exposición al AD puede asociarse a la activación de dos vías de acción:

**Tabla 1.** Lesiones histopatológicas por exposición al AD en distintos grupos de vertebrados.

<b>Especie</b>	<b>Tipo de exposición</b>	<b>Histopatología</b>	<b>Autor</b>
<b>Humano</b> <i>Homo sapiens</i>	Natural	<b>Cerebro:</b> Necrosis Astrocitosis Atrofia neuronal	Teitelbaum (1990)
<b>Macaco cangrejero</b> <i>Macaca fascicularis</i>	Intraperitoneal	<b>Cerebro:</b> Vacuolización del neuropilo Astrocitosis Necrosis	Tryphonas et al., (1990)
<b>Lobo marino de California</b> <i>Zalophus californianus</i>	Natural	<b>Corazón:</b> Vacuolización de citoplasma en cardiomiocitos Separación entre fibras Edema intersticial	Zabka et al., (2009)
<b>Foca marina del Norte</b> <i>Callorhinus ursinus</i>	Natural	<b>Cerebro:</b> Atrofia en hipocampo Pérdida células granulares Pérdida células piramidales Edema en neuropilo <b>Corazón:</b> Degeneración vacuolar en miocardio Necrosis Reemplazo de cardiomiocitos por adipocitos	Lefebvre et al., (2010)
<b>Dorada</b> <i>Sparus aurata</i>	Intraperitoneal	No se reportaron	Nogueira et al., (2010)
<b>Rata</b> <i>Rattus sp.</i>	Intraperitoneal Intrahipocampal	<b>Corazón:</b> Vacuolización de cardiomiocitos Necrosis inflamatoria Infiltración de células inflamatorias	Vranyac-Tramounandas et al., (2011)
<b>Foca común del Pacífico</b> <i>Phoca vitulina richardii</i>	Natural	<b>Cerebro:</b> Necrosis en hipocampo Pérdida neuronal Hemorragias <b>Corazón:</b> Necrosis en miocardio	McHuron et al., (2013)
<b>Ratón</b> <i>Mus musculus</i>	Intraperitoneal	<b>Cerebro:</b> Atrofia en hipocampo Necrosis	Vieira et al., (2015)
<b>Tiburón leopardo</b> <i>Triakis semifasciata</i>	Intraperitoneal	No se reportaron	Schaffer et al., (2016)

1. Inflamación del tejido: Los receptores ionotrópicos de glutamato son canales selectivos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , por lo que cualquier sobreactivación de estos puede resultar en daño tisular osmótico, como inflamación derivada de un flujo constante de cationes y líquido extracelular al interior de la célula (Pulido, 2008).
2. Incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular: El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  es altamente tóxico para las células al activar diferentes vías enzimáticas y cascadas de señalización, incluyendo producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zabaglo et al., 2016) y daño por fosforilación oxidativa (Pulido, 2008). Además de la activación de enzimas nucleares que desencadenan la muerte celular o necrosis oncótica (Zachary et al., 2017).

La actividad cardiotoxica del AD ha sido confirmada por el daño extensivo en el corazón de leones marinos (Zabka et al., 2009) y pez cebra (Hong et al., 2015). Estudios *in vitro* han demostrado que la estimulación de los receptores NMDA en cardiomiocitos puede ocasionar apoptosis (muerte celular) a través del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y ROS (Gao, et al., 2007), así como a fragmentación de fibras musculares e infiltración de leucocitos (McHuron et al., 2013).

### 1.1.3 Efectos conductuales

Aunque los mecanismos moleculares de la intoxicación por AD han sido ampliamente estudiados y parecen ser consistentes entre vertebrados, las relaciones dosis-respuesta y patrones de daño cerebral no son iguales entre los modelos de laboratorio y organismos naturalmente expuestos (Cook et al., 2016). El daño neurológico por AD en mamíferos se localiza principalmente en el hipocampo (Silvagni et al., 2005; Goldstein et al., 2008; Pulido, 2008; Montie et al., 2012; Vieira et al., 2015) ya que es la región del cerebro que posee la mayor concentración de receptores de kainato (Barnabeu & Sharp, 2000; Londo et al., 1980). Por lo anterior, la mayor parte de la investigación conductual en organismos afectados por AD se ha enfocado en el hipocampo y sobre las funciones conductuales y cognitivas que controla (Cook et al., 2016). En leones marinos de California (*Zalophus californianus*) se ha demostrado que la conducta perseverante, que se define como la falta de flexibilidad conductual o la tendencia a repetir comportamientos sin utilidad (Sandson & Alert, 1987), puede llevar a los organismos afectados por el AD a efectuar persistentemente estrategias de forrajeo poco efectivas, convirtiéndolos en depredadores menos eficientes (Goldstein et al.,

2008; Cook et al., 2016).

El hipocampo es una región del sistema nervioso central que no se encuentra desarrollada en todos los organismos, como en los peces (Schaffer et al., 2006). Por lo que pueden existir diferencias potenciales entre especies en el daño neurológico ocasionado por el AD. Esto evidencia la necesidad del uso de modelos animales ecológicamente relevantes para el estudio del efecto de la toxina (Buckmaster et al., 2014; Cook et al., 2015), así como contrastar los efectos neurológicos entre especies, esto permitirá una evaluación más confiable sobre el comportamiento desadaptativo y déficits cognitivos en animales silvestres expuestos naturalmente al AD (Cook et al., 2016).

#### 1.1.4 Efecto del ácido domoico en peces

Posterior al primer evento de intoxicación en humanos ocurrido en el año 1987 (Bates et al., 1989) se han realizado numerosos estudios de laboratorio para evaluar el efecto del AD en diferentes especies de vertebrados. Se han utilizado distintos regímenes de exposición, entre los que se incluyen inyección intraperitoneal y exposición por vía oral (Lefebvre et al., 2007). Los signos excitotóxicos son similares en la mayoría de los vertebrados examinados (Tabla 2). Sin embargo, los peces presentan una respuesta neurotóxica solamente al ser expuestos al AD por vía intraperitoneal. Mientras que la exposición por vía oral no ha manifestado signos evidentes de intoxicación (Hardy et al., 1995; Lefebvre et al., 2007) (Tabla 3). En el caso de los peces, se ha descrito el efecto agudo de la exposición al AD vía intraperitoneal en especies como anchoveta nortea (*Engraulis mordax*), salmón (*Coho salmon*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) enfocándose estos estudios en sus comportamientos (Lefebvre et al., 2001; Lefebvre et al., 2007; Bakke et al., 2010), en los cuales se demostró que los peces presentan una respuesta conductual similar a la descrita para otros grupos de vertebrados al mostrar alteraciones en la forma de nadar, caracterizadas por nado vertical, nado en espiral y nado en círculos (Tabla 3). Por otro lado, peces como salmón, anchoveta y sardina, no mostraron signos de excitotoxicidad al ser expuestos a una única dosis por vía oral, por lo que se concluyó que los peces presentan una tolerancia mayor a la exposición por vía oral al AD en comparación con humanos y mamíferos marinos (Lefebvre et al., 2012).

**Tabla 2.** Signos conductuales de excitotoxicidad en diferentes especies de mamíferos.

Mamíferos				
Especie	Exposición	Dosis mgAD kg <sup>-1</sup>	Signos	Autor
Ratón <i>Mus musculus</i>	Intraperitoneal	0.59	Rascado Convulsiones Muerte	Iverson et al., (1989)
		2.4	Muerte	
Ratón <i>Mus musculus</i>	Oral	9-18	No se reportaron	Iverson et al., (1989)
		35-70	Rascado Convulsiones	
		47-104	Muerte	
Macaco cangrejero <i>Macaca fascicularis</i>	Intraperitoneal	4	Vomito súbito Masticación	Tryphonas et al., (1990)
	Intravenosa	0.025-0.5	Movimiento de labios Masticación Vómito	
Ratón <i>Mus musculus</i>	Intraperitoneal	1.5-2	Reducción de actividad	Vieira et al., (2015)
		2.5	Hiperactividad Convulsiones Pérdida de equilibrio	
		3.5	Muerte	

**Tabla 3.** Signos conductuales de excitotoxicidad en diferentes especies de peces.

Peces				
Especie	Exposición	Dosis mgAD kg <sup>-1</sup>	Signos	Autor
<b>Trucha arcoíris</b> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Oral	50	No se reportaron	Hardy et al., (1995)
<b>Anchoveta norteña</b> <i>Engraulis mordax</i>	Oral	40	No se reportaron	Lefebvre et al., (2001)
<b>Anchoveta norteña</b> <i>Engraulis mordax</i>	Intracelómica	1-14	Desorientación Nado en espiral Muerte	Lefebvre et al., (2001)
<b>Sardina Monterrey</b> <i>Sardinops sagax</i>	Oral	66	No se reportaron	Lefebvre et al., (2002)
<b>Salmón plateado</b> <i>Oncorhynchus kisutch</i>	Oral	10-12	No se reportaron	Lefebvre et al., (2007)
<b>Salmón plateado</b> <i>Oncorhynchus kisutch</i>	Intracelómica	0.25-34	Nado circular Nado en espiral	Lefebvre et al., (2007)
<b>Pez cebra</b> <i>Danio rerio</i>	Intracelómica	0.47	No se reportaron	Lefebvre et al., (2009)
		1.2	Nado errático Nado en círculos Nado en espiral	
<b>Dorada</b> <i>Sparus aurata</i>	Intracelómica	0.45	No se reportaron	Nogueira et al., (2010)
		0.9	No se reportaron	
		9	Nado circular Nado en espiral	

## 1.2 Justificación

La exposición al AD altera el comportamiento de los animales, y aunque el efecto agudo de la intoxicación puede ser fatal, muchos sobreviven a la exposición inicial. Sin embargo, los efectos conductuales persistentes de la exposición al AD pueden interferir con la sobrevivencia a largo plazo, por lo que es necesario estudiarlos en mayor profundidad. Un mejor entendimiento de los efectos conductuales en organismos expuestos de forma continua puede también contribuir al diagnóstico y tratamientos veterinarios (Cook et al., 2016). Existe poco conocimiento sobre los efectos del consumo crónico de AD por vía oral en peces. En trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas durante 15 semanas con alimento contaminado con AD, la toxina no se acumuló en sangre o tejidos por lo que se concluyó que no constituye un riesgo para la salud del animal o del consumidor humano de estos peces (Hardy et al., 1995). Por otra parte, en salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*), anchoveta norteña (*Engraulis mordax*) y sardina Monterrey (*Sardinops sagax*) se observó acumulación de la toxina en hígado, riñón y cerebro al ser expuestos al AD en forma disuelta por vía oral, sin presentar signos de excitotoxicidad (Lefebvre et al., 2001; Lefebvre et al., 2002; Lefebvre et al., 2007). Los peces pueden acumular toxinas en sus órganos sin manifestar signos de toxicidad (Lefebvre et al., 2001; Lefebvre et al., 2007). Sin embargo, la presencia de AD en órganos clave como el cerebro y corazón puede representar un riesgo para la salud de los animales al ocasionar lesiones por exposición a largo plazo. Además, los peces pueden llegar a convertirse en vectores no convencionales para otros organismos e incluso significar un riesgo a la salud pública. Existe la posibilidad de que la toxina se encuentre en alimentos balanceados usados en acuicultura u otros sectores agropecuarios. Dado que la harina de pescado se produce a partir de sardinas y/o anchovetas que pueden acumular cantidades importantes de AD cuando estén expuestas a FAN de especies productoras de esta toxina. Si el AD resiste el proceso de fabricación, esto resultaría en alimentos balanceados contaminados, representando un riesgo potencial para la salud de los animales que consumen dichos alimentos y para los consumidores humanos.

## 1.3 Hipótesis

El ácido domoico adquirido a través del alimento representa un riesgo para la industria acuícola y para otras industrias que utilizan la harina de pescado. La acumulación de la toxina produce efectos

excitotóxicos que se manifiestan en alteraciones en órganos, procesos fisiológicos y conductuales que pueden resultar en eventos de mortandad de organismos de cultivo.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

- Determinar el efecto del ácido domoico adquirido a través del alimento en especies de importancia acuícola, así como evaluar la estabilidad de la toxina durante la producción de harina de pescado.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el daño tisular generado en el cerebro y el corazón de *Totoaba macdonaldi* y *Morone saxatilis* por la ingesta de ácido domoico en alimento fresco, con especial atención a las alteraciones estructurales cerebrales.
- Determinar las respuestas conductuales específicas en *Totoaba macdonaldi* y *Morone saxatilis* inducidas por el consumo de ácido domoico.
- Analizar la presencia y persistencia del ácido domoico en las distintas etapas del proceso de elaboración de harina de pescado y alimentos balanceados.
- Determinar los efectos del consumo de alimento balanceado con ácido domoico en un modelo mamífero.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Ensayo de ingesta de alimento fresco con ácido domoico en *Totoaba macdonaldi* y *Morone saxatilis*

#### 2.1.1 Organismos de *Totoaba macdonaldi* y *Morone saxatilis*

Se obtuvieron 45 juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (peso promedio =  $3.47 \pm 0.94$  g DE; 3.2 meses de edad) producidos por la Unidad de Biotecnología y Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas (FMC) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y se obtuvieron 45 juveniles de lobina rayada (*Morone saxatilis*) (peso promedio =  $16.2 \pm 3.93$  g DE) producidos por la empresa Pacifico Aquaculture de Ensenada, Baja California. Los organismos se distribuyeron en tres acuarios de 20 L (15 organismos por acuario) equipados con un filtro de cascada y bombas de aireación. Se mantuvo una temperatura entre 17 y 20 °C y un fotoperiodo de 14:10 (L:O). Se realizaron cambios de un tercio de agua de cada acuario diariamente. Los organismos fueron aclimatados durante 10 días previo al inicio de cada experimento. Los peces fueron alimentados a saciedad dos veces al día con una dieta de pellet comercial (EWOS salmon diet, Astra-Ewos, AB, Sweden) durante el periodo de aclimatación.

#### 2.1.2 Preparación de dietas

Se prepararon dietas de alimento fresco (sardina) empleando material de referencia certificado (National Research Council of Canada) para ácido domoico (CRM-ASP-Mus-D). El material fue mezclado con sardina que fue capturada en Bahía Todos Santos en enero de 2021 y que fue analizada para presencia de ácido domoico, encontrándose libre de la toxina. La sardina fue molida y mezclada con el material de referencia para obtener una dieta experimental con una concentración esperada de  $0.801 \mu\text{g AD g}^{-1}$ . Se añadió grenetina a la mezcla de sardina molida para obtener un alimento consistente. El alimento se colocó en bolsas de plástico con cierre hermético y se mantuvieron en congelación hasta su utilización. Para la dieta del grupo control se llevó a cabo

el mismo procedimiento con material de referencia control (CRM-Zero-Mus)

### 2.1.3 Análisis de dietas por HPLC

Los alimentos preparados fueron analizados mediante un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS) para cuantificar la concentración de ácido domoico (AD). La extracción se realizó en tubos de plástico color ámbar donde se colocó la muestra y se añadió el solvente de extracción (MeOH 50%) en una relación 1:4. Las muestras fueron homogenizadas en un homogeneizador de tejidos durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró utilizando filtros de polipropileno Agilent Technologies de 0.2 µm de tamaño de poro, el filtrado se recuperó en un tubo ámbar de 1.5 ml. Se añadió ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final de 0.15%.

El análisis por LC-MS/MS se realizó siguiendo el protocolo descrito por Mafra et al. (2009). Utilizando un espectrómetro de masas Agilent 6470 con triple cuadrupolo con fuente de ionización electrospray que utiliza nitrógeno como gas de nebulización y una columna analítica Agilent Zorbax Eclipse Plus-C18 (100 x 2.1 mm de diámetro interno, tamaño de poro 1.8 µm). El tiempo de corrida fue de ocho minutos a una temperatura de 45°C con un flujo constante de 0.25 ml min<sup>-1</sup>. La fase móvil fue agua + ácido fórmico (0.2%) como solución A y acetonitrilo + ácido fórmico (0.2%) como solución B. El gradiente de bombeo en dicha fase fue (Tiempo, %B): 0 min, 10%, 4 min, 35%, 7.3 min, 35% y 8 min, 10%.

### 2.1.4 Bioensayo de alimentación

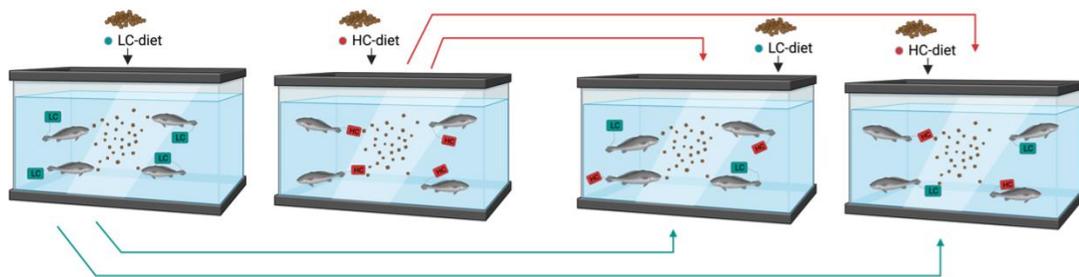
Para cada especie se seleccionó un acuario para el grupo experimental y otro para el grupo control. Transcurrido el periodo de aclimatación al sistema se llevó a cabo la transición de dieta comercial (DC) a alimento fresco con AD (AF-AD) de la siguiente manera: durante los primeros 14 días se alimentaron 50% DC – 50% AF-AD. El día 15 se hizo la transición a 100% AF-AD. Grupo experimental y grupo control fueron alimentados a saciedad aparente dos veces al día y los organismos fueron observados para detectar cualquier comportamiento inusual. Al ocurrir el rechazo del alimento

contaminado con ácido domoico se continuó la alimentación con dieta comercial hasta completar 90 días.

## 2.1.5 Pruebas conductuales

### 2.1.5.1 Prueba de aprendizaje conductual en *Morone saxatilis*

Cuando los organismos de lobina rayada que consumían la dieta experimental (HC-Diet) cesaron el consumo de la misma, cuatro organismos fueron marcados con un identificador en la aleta caudal y transferidos al acuario donde se encontraban los organismos de la dieta control (LC-Diet). También, cuatro organismos que recibían la dieta control (LC-Diet) fueron marcados y transferidos al acuario de los organismos que recibían la dieta experimental (HC-Diet). El esquema de alimentación se mantuvo de la forma original (Figura 1). El comportamiento de los organismos fue evaluado en ambos acuarios.



**Figura 1. Montaje de prueba conductual de aprendizaje.** Se indica con etiqueta roja los organismos previamente expuestos a la dieta experimental con alta concentración de AD (Dieta-HC). Con etiqueta azul los organismos previamente expuestos a la dieta control con baja concentración de AD (Dieta-LC). Organismos con etiqueta roja fueron transferidos al acuario que recibe dieta-HC y viceversa.

## 2.1.5.2 Prueba de luz/oscuridad en *Totoaba macdonaldi*

### 2.1.5.2.1 Descripción de la prueba

El protocolo de la prueba de luz/oscuridad o escototaxis (preferencia por oscuridad) es un modelo para peces que es utilizado para evaluar los efectos conductuales de sustancias tóxicas, así como los efectos de agentes farmacológicos (Maximino et al., 2010). La prueba se basa en la preferencia natural por el entorno oscuro que ha sido documentada en algunas especies de peces (Sandoval-Herrera et al., 2019) como pez cebra (*Danio rerio*), mojarra oreja azul (*Lepomis macrochirus*), ginbuna (*Carassius niloticus*), pez tetra cardenal (*Paracheirodon axelrodi*) y morena de California (*Gymnotus carapo*) (Serra et al., 1999; Yoshida et al., 2005; Gouveia et al., 2005; Maximino et al., 2007). Este comportamiento se denomina escototaxis y funciona como una estrategia de defensa para evitar a los depredadores, ya que los lugares oscuros hacen más difícil distinguirlos del sustrato (Sandoval-Herrera et al., 2019).

Para la prueba de escototaxis los individuos se colocaron en un compartimento de intersección localizado entre un compartimento claro y uno oscuro. La intersección está delimitada por dos puertas de acrílico transparente que son removidas luego de un intervalo de habituación de cinco minutos. El organismo puede explorar libremente el espacio mientras que el observador registra su comportamiento durante 15 minutos. Los efectos ansiolíticos (aumento del tiempo en el compartimento claro) pueden determinarse simultáneamente con una medida del incremento o disminución de la actividad natatoria (el número total de entradas en ambos compartimientos) (Maximino et al., 2010). Esta última es un parámetro frecuentemente utilizado en estudios toxicológicos debido a que cambios en la actividad motora comúnmente reflejan un efecto en el sistema nervioso (Sosa y Nunes, 2020). Esto puede representar un indicador de importancia ecológica al condicionar procesos biológicos comunes como alimentación, evasión de depredadores, actividad reproductiva y camuflaje (Sosa y Nunes, 2020).

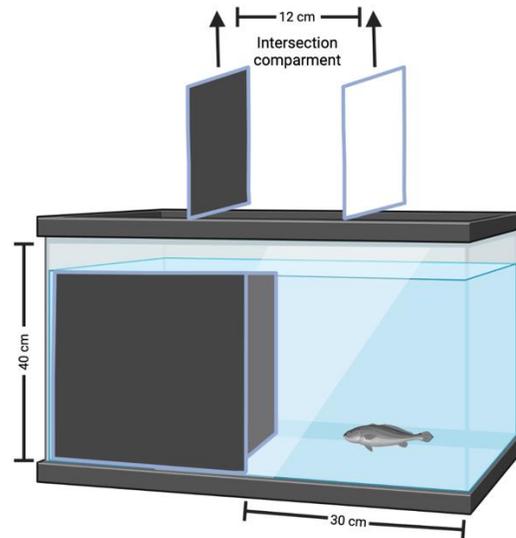
### 2.1.5.2.2 Aplicación de la prueba

Se utilizó un acuario de 15 L similar al descrito por Maximino et al. (2010) (Fig. 2), dividido en dos

compartimentos iguales, una mitad clara y una mitad oscura. Las paredes y el fondo del acuario fueron cubiertos con papel adhesivo no reflectante blanco o negro, garantizando un sustrato uniforme para cada compartimento y con la finalidad de evitar la tendencia a formar cardúmenes o interactuar con el propio reflejo. El acuario incluía dos puertas corredizas de acrílico coloreadas por la parte interna del mismo color del lado del acuario que correspondía, obteniendo así un compartimento central. Cada individuo fue removido del acuario de mantenimiento y fue colocado en un recipiente temporal de transporte para llevarlo hacia el acuario de prueba. Utilizando una red el organismo fue colocado en el compartimento central del acuario de prueba. Después de un periodo de habituación de cinco minutos, las puertas de acrílico fueron removidas permitiendo al organismo explorar el acuario de prueba. La actividad fue registrada durante un periodo de 15 minutos utilizando una cámara colocada en la parte superior del acuario y se evaluaron los siguientes parámetros en cada organismo:

- Número de entradas a cada compartimento. Se consideró una entrada cuando dos terceras partes de la longitud total del organismo se encontraban en uno de los compartimentos.
- Tiempo (segundos) en cada compartimento.
- Número de eventos de “congelamiento”: se definió como la ausencia de actividad natatoria durante más de 10 segundos.
- Tigmotaxis. Es la tendencia de un organismo a permanecer cerca de las paredes del acuario. Se midió el tiempo (segundos) durante el cual el organismo permaneció con contacto con las paredes.

Transcurridos los 15 minutos de la prueba, el organismo fue removido del acuario de prueba utilizando una red y fue colocado en un acuario temporal de “descarte” hasta que se realizaron las pruebas con todos los organismos del acuario de mantenimiento.

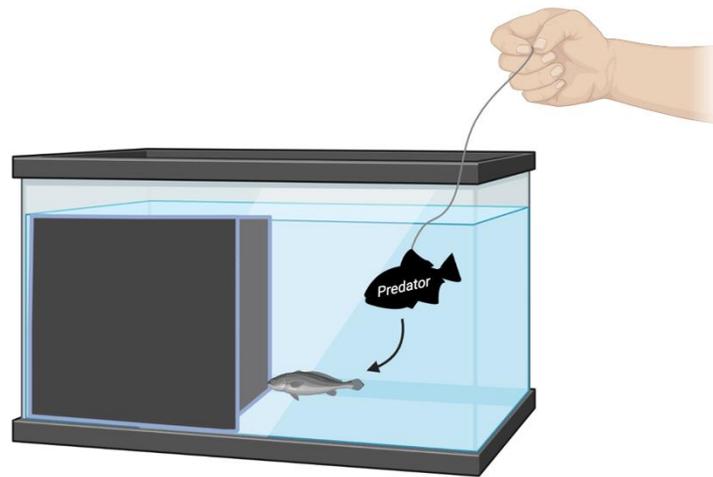


**Figura 2. Acuario para prueba de luz/oscuridad (escototaxis).** El acuario se divide en una sección oscura (paredes cubiertas con papel negro) y una sección clara (paredes sin cubrir). En la parte media del acuario hay un compartimento de intersección delimitado con puertas móviles donde el organismo es colocado para su habituación previo al inicio de la prueba.

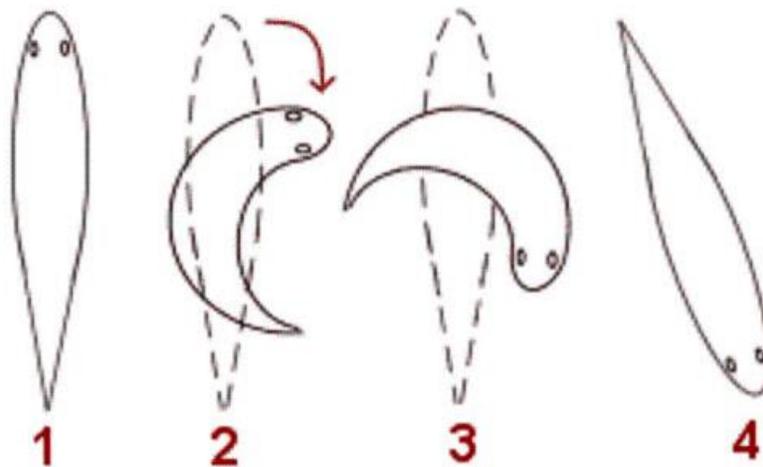
### 2.1.5.3 Prueba de conducta antidepredador en *Totoaba macdonaldi*

#### 2.1.5.3.1 Procedimiento

La prueba antidepredador fue utilizada para evaluar la respuesta de escape de los organismos expuestos a AD y de los organismos control ante un ataque simulado de un depredador. Se utilizó un modelo de silicón de un pez león (*Pterois sp.*) para simular el ataque. Cada organismo fue colocado en un nuevo acuario separado del resto del grupo. Luego de un periodo de habituación de cinco minutos, el “depredador” fue introducido en el acuario generando una perturbación el agua (Fig. 3) que simuló un ataque repentino. Se grabó la respuesta de cada organismo con una cámara colocada en la parte superior del acuario. La respuesta de escape se definió como el tiempo transcurrido entre la entrada del depredador y la flexión del pedúnculo caudal del organismo (C-startle reflex) (Fig. 4), y el tiempo se midió con el análisis posterior de los videos obtenidos de cada prueba (Fig. 4).



**Figura 3. Acuario para prueba antidepredador.** La prueba se realiza en el mismo acuario que la prueba de luz/oscuridad. Se indica la manera en que el modelo de silicón del depredador es ingresado al acuario.



**Figura 4. Reflejo de arranque en C (C-start reflex).** Flexión del pedúnculo caudal en peces como técnica de escape.

#### 2.1.5.4 Análisis de videos de pruebas conductuales

Los videos obtenidos durante cada sesión de las pruebas conductuales fueron analizados utilizando el software CowLog, software de código abierto para codificar comportamientos a partir de video

digital (Hänninen y Pastell, 2009).

### 2.1.6 Muestreo de organismos: eutanasia y disección

Los días 0, 7, 14, 60 y 90 se recolectaron tres individuos de cada acuario. Los organismos eran capturados con red y colocados en agua fría para su aletargamiento, posteriormente se realizó eutanasia por corte de branquias. Se realizó disección completa a través de una incisión entre las aletas ventrales que se prolongó hacia la mandíbula y posteriormente hacia el ano, y se extrajeron corazón e hígado completos. Posteriormente, se realizó un corte en el cráneo para extraer el cerebro completo. Todos los órganos se enjuagaron con agua destilada y fueron colocados en casetes de histología y las muestras se conservaron en formol al 10% hasta su procesamiento.

### 2.1.7 Análisis histológico

El análisis histológico de las muestras se realizó siguiendo la técnica descrita por Ross y Pawlina (2009). Las muestras contenidas en los casetes de histología preservadas en formol al 10% fueron transferidas a etanol al 70% durante 60 minutos. Posteriormente se sometieron a un proceso de deshidratación en baños sucesivos en soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico, diafanización en xileno y posterior inclusión en parafina. Este proceso se llevó a cabo en un procesador automático de tejidos LEICA TP 1020. Al finalizar la deshidratación se formaron bloques de parafina utilizando un centro de inclusión LEICA EG 1150. Una vez formados los bloques se colocaron en una placa de enfriamiento LEICA EG 1150 para la solidificación homogénea de la parafina en los bloques. Se realizaron cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo LEICA RM 2125, obteniéndose cortes transversales de mesencéfalo y metaencéfalo para cerebro y cortes longitudinales para corazón. Los cortes se extendieron en un baño de agua destilada para su posterior fijación a portaobjetos. Las laminillas se dejaron secar en una estufa a 50°C durante 24 horas para posteriormente pasar por un proceso de desparafinización y tinción utilizando la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E). Finalmente, las muestras fueron montadas sobre portaobjetos utilizando resina Cytoseal y cubiertas con cubreobjetos de vidrio.

### 2.1.8 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de signo de Wilcoxon (Wilcoxon et al., 1970) para comparar el peso de los organismos al inicio y al final de cada experimento. Se evaluaron los siguientes parámetros de crecimiento (García-Perez et al., 2018):

$$\text{Ganancia de peso} = FW - IW$$

$$\text{Ganancia de peso promedio diaria} = (FW - IW) / \text{Days}$$

$$\text{Tasa específica de crecimiento} = (\ln(FW) - \ln(IW)) * 100$$

Donde:

FW: el peso en gramos al término del ensayo

IW: el peso en gramos al inicio del ensayo

Ln: logaritmo natural

Para cada indicador conductual evaluado, se calculó el cambio en unidades relativas (U.R.) comparando la respuesta de cada individuo en un momento dado de la prueba ( $t_n$ ) con respuesta obtenido el día 0 ( $t_0$ ). Para cada indicador, los datos de los organismos en prueba de exposición al AD y control fueron comparados utilizando una prueba t-Student. Cuando los datos no cumplían los requisitos de normalidad y homocedasticidad se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon (Wilcoxon et al., 1970). La significancia estadística se evaluó a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Para el análisis de los datos se utilizó el programa STATISTICA (Data Analysis Software System) versión 14 ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

#### 2.1.8.1 Análisis Probit

Para evaluar el efecto de la dieta-HC sobre la respuesta conductual (tiempo de escape ante un

depredador hipotético), se aplicó un modelo de regresión Probit. Esta técnica permite analizar la relación entre el tiempo de exposición (en días) y la respuesta conductual transformada a escala Probit, la cual representa la proporción acumulada de individuos que exhiben la conducta evaluada (Finney, 1971).

Se construyeron dos curvas, una para los organismos expuestos a la dieta-HC y otra para el grupo control. Los valores de Probit se calcularon a partir del tiempo de respuesta al estímulo y se ajustaron curvas de regresión a los datos de cada grupo. Esto permitió comparar patrones de respuesta conductual entre grupos y estimar parámetros como el Emax (efecto máximo observado). El análisis se realizó en Microsoft Excel y los resultados fueron representados gráficamente, incluyendo líneas de referencia para Emax.

## **2.2 Evaluación de morfología cerebral en *Totoaba macdonaldi***

### **2.2.1 Mantenimiento de organismos**

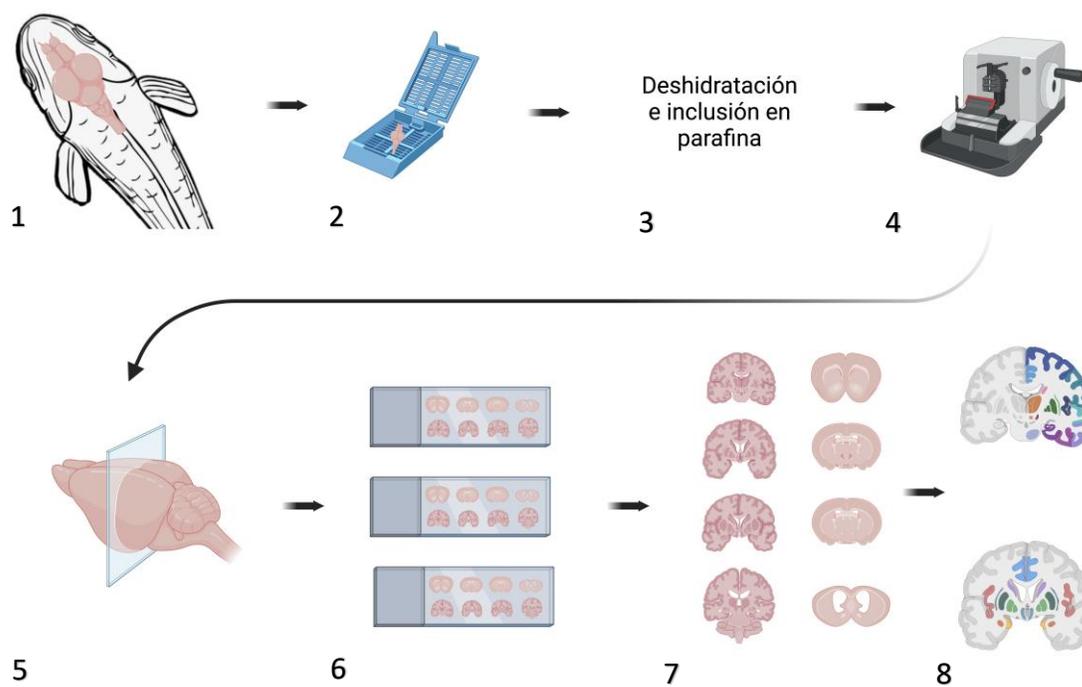
En una segunda etapa de bioensayos se utilizó un total de 21 juveniles de totoaba (peso promedio =  $1.73 \pm 0.60$  g DE) distribuidos en 3 acuarios (n=7) de 20 litros (dos acuarios experimentales y uno control). Los organismos de los acuarios experimentales fueron alimentados con la dieta experimental que contenía ácido domoico ( $0.776 \mu\text{gAD g}^{-1}$ ) durante 45 días, mientras que el grupo control fue alimentando con pellet comercial.

### **2.2.2 Eutanasia y disección**

Los organismos se colocaron en agua fría para inducir su aletargamiento y posteriormente se realizó eutanasia por corte de branquias. Los organismos fueron decapitados y el cráneo se abrió dorsalmente para exponer el cerebro, los cuales fueron removidos utilizando pinzas de disección y se preservaron en formol al 10% durante un periodo de un mes previo a su procesamiento.

### 2.2.3 Cortes seriados

Los cerebros fueron procesados mediante la técnica de inclusión en parafina (Ross y Pawlina, 2009). Se realizaron cortes transversales de 5  $\mu\text{m}$  del órgano completo y se obtuvieron 50 laminillas por órgano analizados. Las laminillas fueron teñidas utilizando la técnica de hematoxilina-eosina (Ross y Pawlina, 2009).



**Figura 5. Técnica histológica de cortes seriados.** 1) Extracción de cerebro completo 2) Cerebro en casete de histología 3) Deshidratación e inclusión en parafina 4) Obtención de cortes con microtomo 5) Obtención de cortes transversales seriados del cerebro 6) Preparación y montaje de laminillas 7) Obtención de imágenes de secciones transversales del cerebro 8) Identificación de regiones afectadas por el AD.

### 2.2.4 Procesamiento de imágenes

Se seleccionaron tres series de laminillas de cerebros expuestos a AD y tres series de cerebros control para documentación fotográfica. Mediante edición digital se eliminaron artefactos y otras estructuras indeseadas, como el contenido ventricular. Las laminillas fueron analizadas utilizando un microscopio Leica DM2000 y con el software Leica Acquire se obtuvieron cinco imágenes de cada

laminilla. Las imágenes fueron compuestas en una sola figura utilizando BioRender ([www.biorender.com](http://www.biorender.com)). Las estructuras que se perdieron al extraer el cerebro de la cavidad craneal se representaron con líneas punteadas cuando fue necesario. Las figuras más representativas de cada serie analizada fueron seleccionadas en función de la aparición de nuevas estructuras. Los números que identifican cada sección en la Fig.3 se presentan arbitrariamente respecto a la sección I. La identificación de las regiones cerebrales fue basada en la descripción bibliográfica del cerebro de la dorada (*Sparus aurata*) (Muñoz-Cueto et al., 2001).

## **2.3 Evaluación del efecto del ácido domoico en alimento balanceado en un modelo mamífero**

### **2.3.1 Mantenimiento de organismos**

Ratones (*Mus musculus*) machos de 21 días de edad fueron adquiridos en colaboración con el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California campus Valle de las Palmas. 12 ratones (peso promedio =  $14.20 \pm 4.14$  g DE) fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos (n=3), tres grupos experimentales y un grupo control. Los ratones fueron mantenidos en una habitación con temperatura entre 21-24 °C con un ciclo de luz/oscuridad 12/12 horas.

### **2.3.2 Preparación de harina de pescado**

Se obtuvieron muestras de sardinas y anchovetas durante un florecimiento de *Pseudo-nitzschia sp.* en la región. El material fue analizado para la cuantificación de ácido domoico mediante HPLC-MS/MS. Las muestras con niveles conocidos de ácido domoico se molieron y almacenaron a -4°C antes de la preparación de harina de pescado. Aproximadamente 400 g del material congelado molido se descongelaron y fue cocinado a 100°C al vacío en una olla de presión. El material cocido se secó a 60°C durante 6 horas en un horno convencional. Se tomaron muestras del material molido, cocido y seco para análisis de ácido domoico.

### 2.3.3 Dietas experimentales

Se prepararon tres dietas experimentales y una dieta control. Las harinas de pescado preparadas previamente fueron mezcladas con dieta comercial de ratón. La harina de pescado preparada a partir de material con una concentración conocida de ácido domoico se utilizó para las dietas experimentales. La dieta control se preparó con harina de pescado sin concentraciones de ácido domoico detectables. El material en polvo se mezcló con agua potable para obtener una pasta sólida que se moldeó manualmente en forma de pellets. Las dietas experimentales se denominaron AD-300, AD-500 y AD-800, según la concentración de ácido domoico medida en el material crudo previo a la preparación de la harina de pescado.

**Tabla 4.** Ácido domoico (AD) en material crudo (sardina) utilizado para elaboración de harina de pescado.

<b>Dieta</b>	<b>Contenido de AD en material crudo (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
<b>Control</b>	0
<b>AD-300</b>	339.56
<b>AD-500</b>	513.14
<b>AD-800</b>	857.86

### 2.3.4 Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo durante cuatro semanas. El ciclo de alimentación consistió en alternar tres días de exposición a pellets que contenían ácido domoico y tres días de dieta comercial sin ácido domoico. Una cantidad específica de las dietas experimentales se colocaba en la bandeja de alimentación al mediodía durante los días experimentales. Los pellets no consumidos se retiraban y pesaban a las 18:00 horas. Después de retirar la dieta experimental, se les ofreció pellets comerciales a saciedad. El comportamiento de los ratones se monitoreó de forma presencial durante 2 horas después de la administración de las dietas experimentales. Transcurrido este periodo los organismos fueron monitoreados de forma remota mediante una cámara con sensor de movimiento colocado frente a las jaulas de prueba. Después de dos semanas de exposición, las dosis

de cada grupo experimental se incrementaron: el grupo con la dieta AD-300 pasó a la dieta AD-500 y el grupo con la dieta AD-500 pasó a la dieta AD-800.

### 2.3.5 Eutanasia y disección

Los organismos fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Los organismos se disectaron y se extrajo el cerebro, corazón, hígado y riñón. De cada órgano se separaron dos porciones: una se fijó con formol al 10% para análisis histológico y la otra porción se congeló a -4°C para análisis de ácido domoico por HPLC-MS/MS.

### 2.3.6 Cuantificación de ácido domoico mediante HPLC-MS/MS

Las muestras para la cuantificación de ácido domoico se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (LC-MS/MS, Agilent 6470). Las muestras de harina de pescado, dietas y órganos almacenadas a 4°C se descongelaron a temperatura ambiente. Las muestras se pesaron en tubos Falcon y se añadió el disolvente de extracción (MeOH al 50%) en una proporción 1:4. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se filtró a través de filtro de polipropileno con un tamaño de poro de 0.2 µm. El filtrado se recolectó en tubos ámbar de 1.5 ml. El análisis por LC-MS/MS se llevó a cabo según el método de Mafra et al. (2009).

### 2.3.7 Análisis histológico

Las muestras de cerebro y corazón fueron incluidas en parafina y se realizaron secciones de 3 µm de espesor utilizando un microtomo manual (Leica-RM2125 RT, IL, USA). Se obtuvieron cortes transversales y longitudinales del cerebro, y cortes sagitales del corazón. Las láminas obtenidas se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio Leica DM2000.

## 2.4 Permanencia del ácido domoico en diferentes condiciones de preparación de harina de pescado

### 2.4.1 Preparación de harina de pescado

Se prepararon harinas de pescado a partir de sardinas obtenidas durante un florecimiento de *Pseudo-nitzschia sp.* en la región. El material crudo fue analizado para cuantificación de ácido domoico por medio de HPLC-MS/MS. Se utilizó un lote de 600g de sardina con una concentración conocida de ácido domoico ( $38.22 \mu\text{g AD g}^{-1}$ ). El material fue triturado y cocinado a  $100^{\circ}\text{C}$  al vacío en una olla de presión. El material se dividió en dos partes para someterlo a dos tratamientos distintos.

### 2.4.2 Pruebas de permanencia con antioxidantes

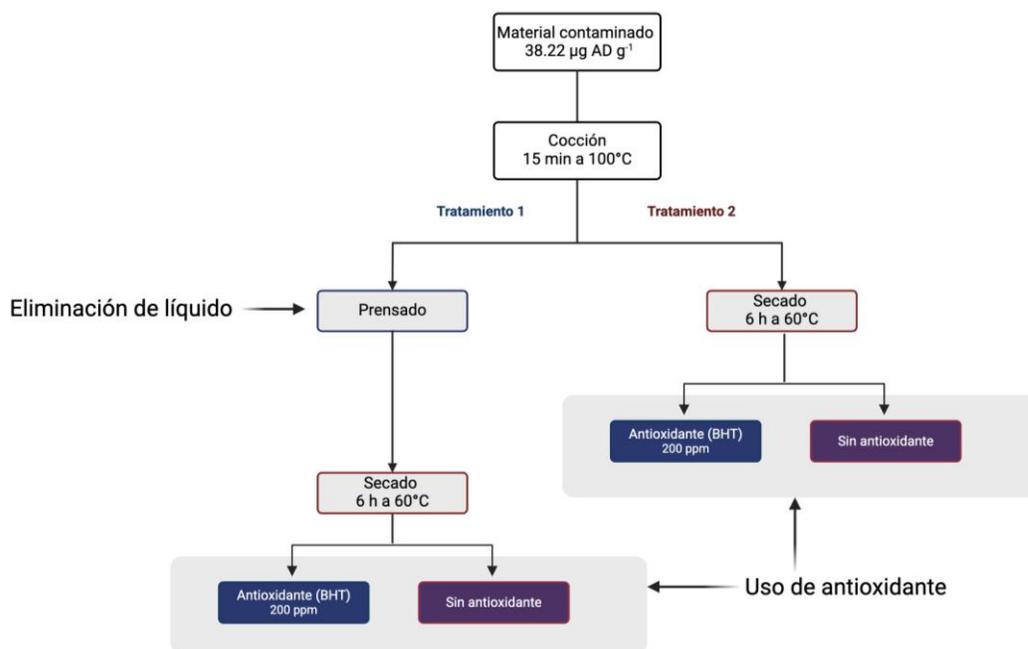
#### 2.4.2.1 Tratamiento 1

El material cocido se prensó manualmente para la eliminación de líquidos. Posteriormente se secó a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 6 horas en un horno convencional. El material seco se dividió en dos porciones, una fue molida directamente para la obtención de la harina y a la segunda porción se le añadieron 200 ppm de antioxidante BHT (butil-hidroxitolueno) (Figura 6). Ambas harinas fueron almacenadas en oscuridad a temperatura ambiente.

#### 2.4.2.2 Tratamiento 2

El material cocido se secó directamente sin prensado. El secado fue a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 6 horas en un horno convencional. El material seco se dividió en dos porciones, una porción fue molida de forma directa para la obtención de la harina y a la segunda porción se le añadieron 200 ppm de antioxidante BHT (butil-hidroxitolueno) (Figura 6). Ambas harinas fueron almacenadas en oscuridad

a temperatura ambiente. De cada tratamiento se obtuvieron muestras por triplicado para análisis y cuantificación de ácido domoico. Las muestras se limpiaron en cartuchos de fase sólida (SPE) y posteriormente se analizaron por HPLC-MS/MS.



**Figura 6. Diseño experimental de tratamientos para evaluación de permanencia del ácido domoico durante la elaboración de harina de pescado.** Tratamiento 1 con eliminación de licor de prensa y tratamiento 2 secado directo del material cocido sin paso de eliminación de licor de prensa. Para ambos tratamientos se realizó un subtratamiento de añadir antioxidante (BHT) al producto final.

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Ensayo de ingesta de alimento fresco con ácido domoico en *Totoaba macdonaldi* y *Morone saxatilis*

#### 3.1.1 Contenido de ácido domoico en dietas

Ambas dietas presentaron concentraciones de AD detectables. Las dietas se clasificaron como dieta-LC (Low concentration) con un contenido de  $0.114 \mu\text{gAD g}^{-1}$ . La segunda dieta se denominó dieta-HC (High concentration) con un contenido de  $0.776 \mu\text{gAD g}^{-1}$ . No se obtuvo un control absoluto ya que las sardinas utilizadas en la mezcla para el alimento contenían bajas cantidades de AD incluso en ausencia de florecimiento de especies productoras de la toxina. Por lo tanto, se consideró como control la dieta con la más baja concentración de AD. El ensayo de exposición consistió en comparar dos dietas con diferente concentración de AD.

#### 3.1.2 Efecto del AD en *Totoaba macdonaldi* y *Morone saxatilis*

##### 3.1.2.1 Peso de organismos

En ambas especies, no se encontraron diferencias significativas (t-Student,  $p > 0.5$ ) en ganancia de peso, tasa específica de crecimiento o en ganancia de peso promedio diaria entre el grupo con la Dieta-HC y control (Tabla 5).

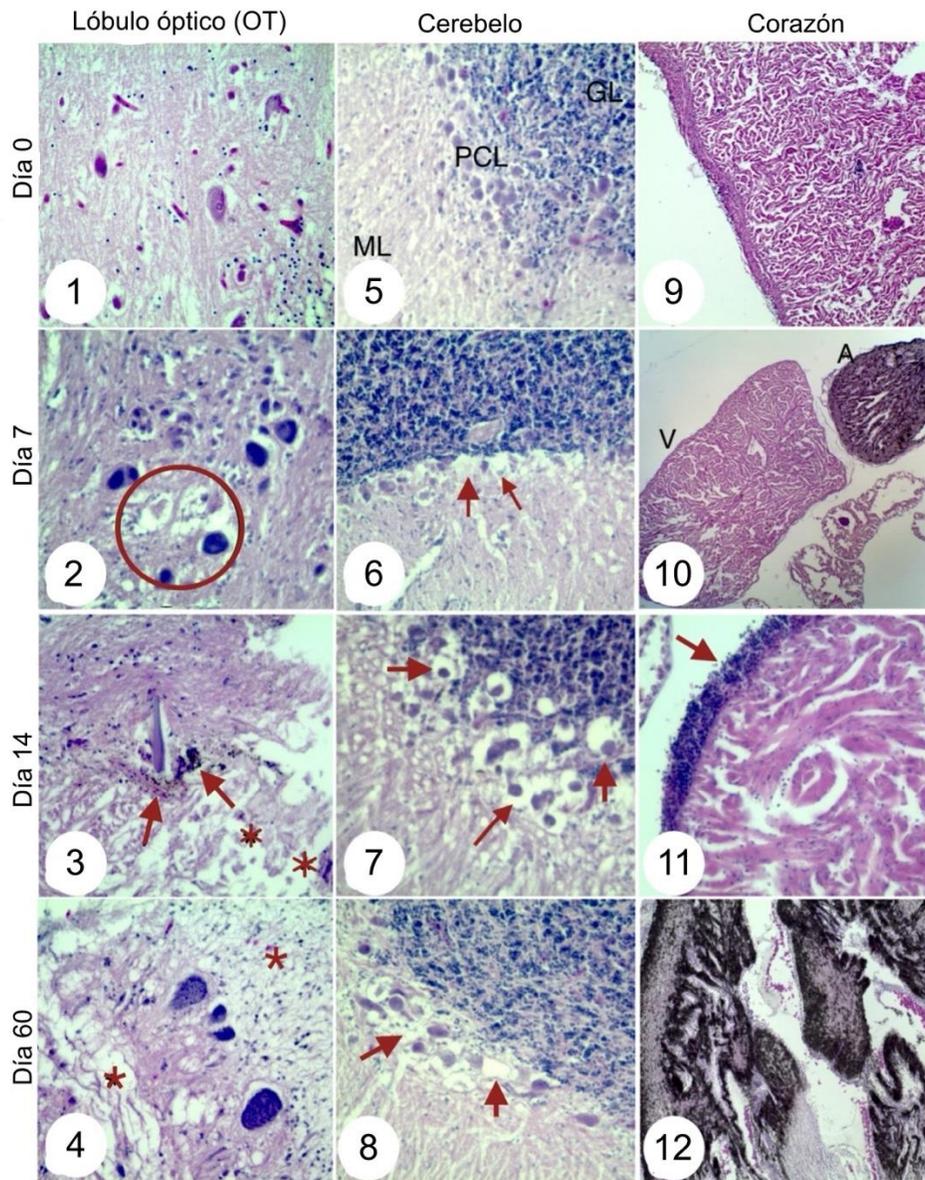
**Tabla 5.** Parámetros de crecimiento para juveniles de lobina rayada y totoaba alimentados con dietas con ácido domoico.

	Lobina rayada		Totoaba	
	Dieta-LC	Dieta-HC	Dieta-LC	Dieta-HC
Peso inicial (g)	16.2 ± 3.9	16.9 ± 3.8	3.5 ± 0.8	3.4 ± 0.9
Peso final (g)	15.8 ± 3.7	17.7 ± 3.5	10.2 ± 3.4	13 ± 4.0
Ganancia de peso (g)	-0.35	0.8	6.68	9.61
Tasa específica de crecimiento (%)	-0.31	0.66	2.36	2.97
Ganancia promedio de peso diaria (g)	-0.05	0.11	0.15	0.21

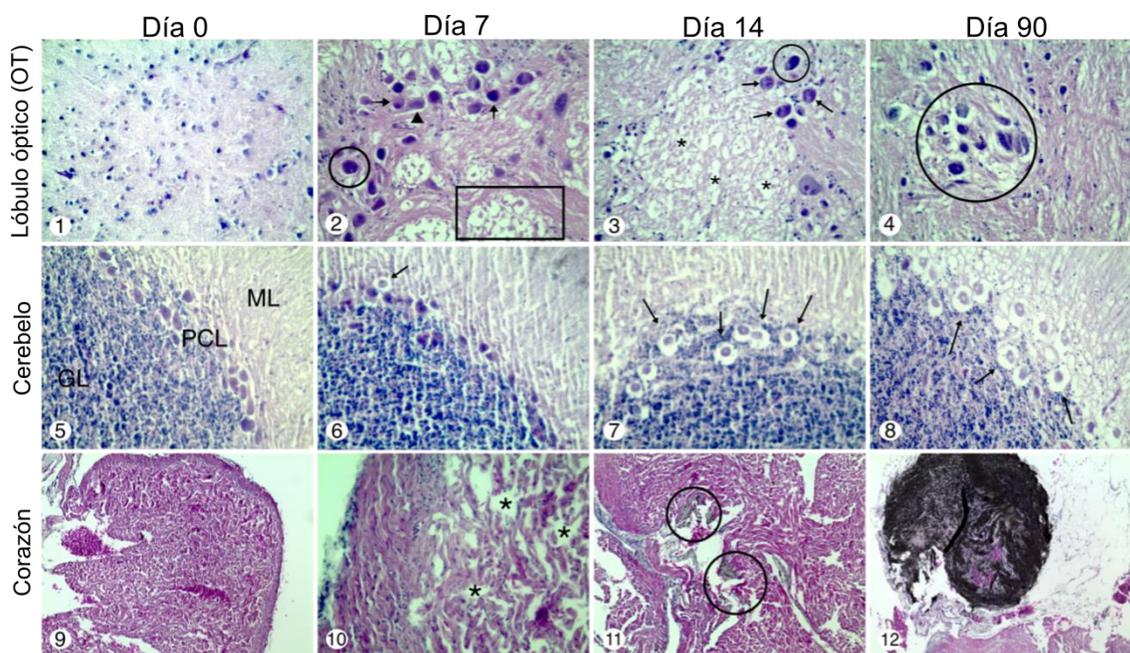
### 3.1.2.2 Daño en tejido cerebral y cardíaco en totoaba y lobina rayada

Los organismos de ambas especies alimentados con la dieta-HC mostraron lesiones evidentes en cerebro y corazón. En cerebro, las lesiones comenzaron en el lóbulo óptico caracterizadas por neuronas con necrosis oncótica, una alteración caracterizada por ganancia de volumen celular y cambios en la estructura del núcleo celular. Así como cambio esponjiforme del neuropilo, que se manifiesta como aparición de vacuolización del neuropilo de la sustancia gris, luego de siete días de exposición al AD (Fig. 7.4). Al día catorce se registraron daños tisulares en el cerebelo que se continuaron extendiendo aún después del cese la exposición al AD en el alimento (Fig. 7.8). No hubo recuperación en las lesiones de organismos al realizar el cambio a pellet comercial, por lo tanto, el cambio de dieta experimental a pellet no influyó en los resultados del experimento.

Además de las lesiones cerebrales, el corazón de los organismos que recibían la dieta-HC mostró melanismo focal en los atrios izquierdo y derecho de este órgano (Fig. 7.6; 7.12). En lobina rayada, al día 7 del ensayo se observó separación entre fibras musculares en miocardio y al día 14, se presentó necrosis en cardiomiocitos. Los organismos de ambas especies alimentados con la dieta-LC no presentaron daño tisular en cerebro o corazón.



**Figura 7. Daño en tejido cerebral y cardiaco de *Totoaba macdonaldi* después del consumo de AD en alimento.** Lóbulo óptico (OT) (1), cerebelo (5) y, corazón (9) sin daño tisular en el día 0. OT (2) son pérdida de neuropilo y neuronas con necrosis oncótica (círculo), vacuolización de células de Purkinje en cerebelo (6), corazón (10) con melanismo atrial y ventrículo (V) sin alteraciones después de 7 días de iniciar el consumo de AD. Al día 14, el OT presentó gránulos de melanina en la parte externa de las células neuronales (flechas) y pérdida de neuropilo (3), el cerebelo presentó vacuolización de las células de Purkinje (7) el corazón presentó acumulación de núcleos celulares en la periferia del ventrículo y separación entre fibras musculares (11). Al día 60, las neuronas del OT presentaron gránulos citoplasmáticos (centro de la imagen) y pérdida de neuropilo (4). El cerebelo presentó vacuolización de las células de Purkinje (8) y el corazón mostró melanismo en los atrios izquierdo y derecho (12).



**Figura 8. Daño en tejido de *Morone saxatilis*.** 1) OT día 0. Tejido sin alteraciones. 2) OT día 7. Neurona con núcleo condensado (picnosis) (flechas). Neurona con núcleo fragmentado (karyorhexys) (círculo). Necrosis licuefactiva caracterizada por cambio esponjiforme del neuropilo (rectángulo). 3) OT día 14. Necrosis licuefactiva. Neuronas con karyorhexys (flechas). Neurona con núcleo condensado (círculo) 4) OT día 90. Neuronas en diferentes niveles de necrosis oncótica (círculo) 5) CER día 0. ML=capa molecular. PCL= capa de células de Purkinje. GL=capa granular. 6, 7, 8) Vacuolización en capa de células de Purkinje (flechas). 9) HT día 0. Fibras musculares normales. 10) HT día 7. Edema intersticial en miocardio. 11) HT día 14. Necrosis en cardiomiocitos (círculo). 12) HT día 90. Melanismo atrial. Hematoxilina-eosina.

### 3.1.3 Pruebas conductuales

No se detectó una típica respuesta excitotóxica en los organismos expuestos al AD a través del alimento. Sin embargo, la observación de que el AD produce importantes alteraciones tisulares y estructurales en diferentes regiones cerebrales nos llevó a evaluar las posibles afectaciones neuroconductuales en los organismos expuestos a través del uso de pruebas conductuales estandarizadas para evaluar el efecto de toxinas en peces.

#### 3.1.3.1 Prueba de aprendizaje conductual en *Morone saxatilis*

En la prueba de aprendizaje con *M. saxatilis* los individuos que originalmente consumían la dieta-HC comenzaron a consumir la dieta-LC luego de dos días de exposición y continuaron rechazando la

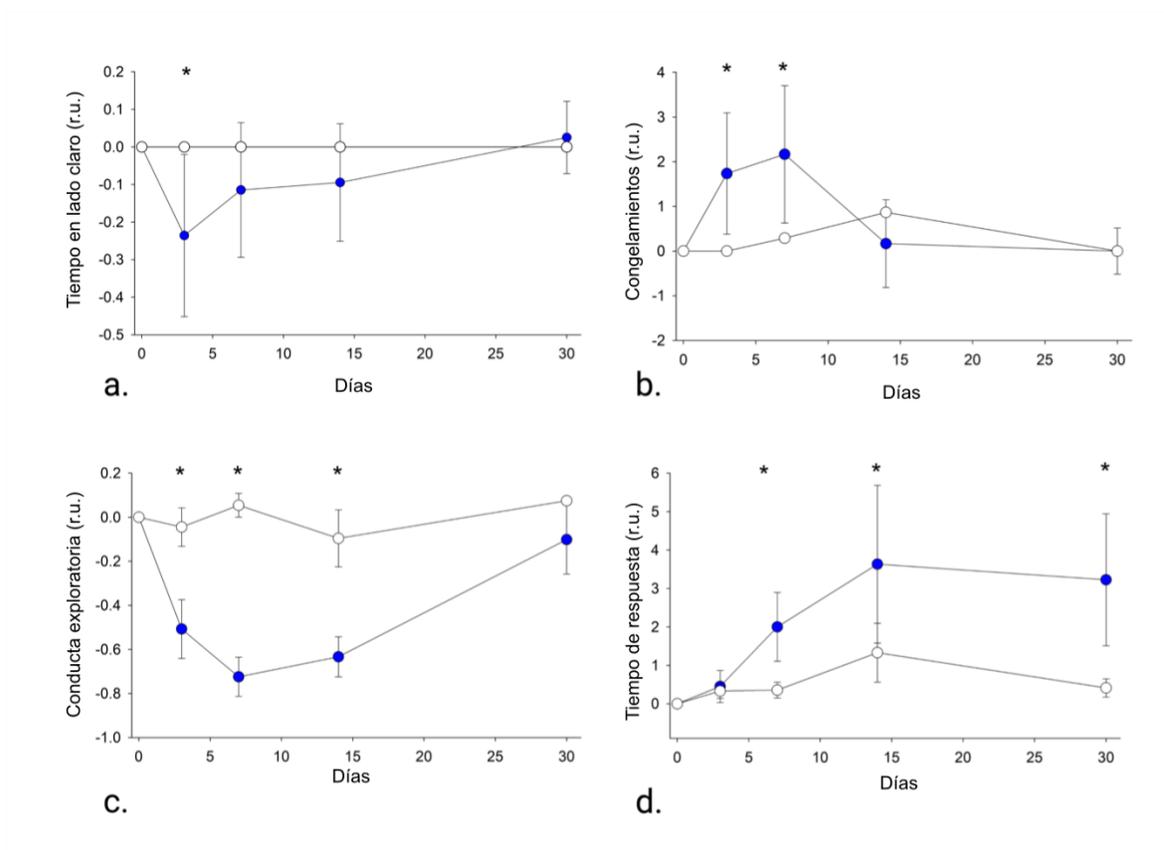
dieta-HC. Por otra parte, los peces-LC (organismos que inicialmente consumieron dieta control (Dieta-LC) consumieron ambas dietas, pero rechazaron la dieta-HC al día 7. Estos resultados sugieren que el rechazo de la dieta-HC está asociado con una conducta aprendida debido a que los organismos detectan la presencia de la toxina en el alimento.

### 3.1.3.2 Prueba de luz/oscuridad

La prueba de luz/oscuridad es utilizada para evaluar la ansiedad en peces, y se basa en la preferencia que algunas especies muestran por los ambientes oscuros (Maximino et al., 2010). Esta prueba también evalúa diferentes indicadores conductuales como actividad exploratoria o comportamiento de inmovilidad en lo que ligeras alteraciones podrían ser indicadores de daños neurológicos. Los peces alimentados con pellet comercial mostraron una marcada preferencia por el lado claro del acuario de prueba al mantenerse ahí durante todo el periodo de prueba (Fig. 8A). En contraste, los peces expuestos al AD permanecieron menos tiempo en el lado claro del acuario, al compararlos con los peces de pellet comercial. Esto fue evidente los días 3 y 7 luego del inicio de la exposición (Fig. 8A). También en estos días se presentó un incremento significativo en el número de comportamientos de inmovilidad (sin actividad natatoria por un periodo mayor a 10 segundos) y una disminución abrupta en la conducta exploratoria en los organismos expuestos al AD (t-Student,  $p < 0.5$ ; Fig. 8b). El tiempo de conducta exploratoria fue aproximadamente 80% más bajo que aquel medido al inicio del experimento en los organismos expuestos (día 0; Fig. 8c).

### 3.1.3.3 Prueba de conducta antidepredador

Dado que el AD afectó dos de los centros integrativos clave para la coordinación motora en el cerebro de los peces (lóbulo óptico y cerebelo), se evaluó el tiempo de respuesta ante el ataque de un depredador hipotético. Los peces expuestos al AD presentaron una respuesta de escape más lenta ( $1.6 \pm 0.46$  segundos DE) en comparación con los peces no expuestos a la toxina ( $0.81 \pm 0.62$  segundos DE) (t-Student,  $p < 0.5$ ; Fig. 9d). Después de 30 días del inicio de la exposición al AD, los juveniles de totoaba mostraron una respuesta de escape casi tres veces más lenta comparado con los organismos no expuestos.



**Figura 9. Indicadores conductuales de *Totoaba macdonaldi* alimentada con AD (círculos azules) e individuos sanos (círculos blancos).** A) Tiempo de permanencia en el lado blanco del acuario de prueba. b) Número de eventos de congelamiento. c) Tiempo de conducta exploratoria. d) Tiempo de respuesta de escape ante un depredador hipotético. El cambio (en unidades relativas; r.u.) de cada indicador conductual se evaluó comparando la respuesta de los individuos en cada tiempo de muestreo con la respuesta medida el día 0 (previo al inicio de la ingesta de AD). El promedio y error estándar (n=7) es indicado. \* Representa una diferencia significativa en el indicador conductual de individuos que consumieron AD en cada tiempo de muestreo comparado con la respuesta de individuos sanos.

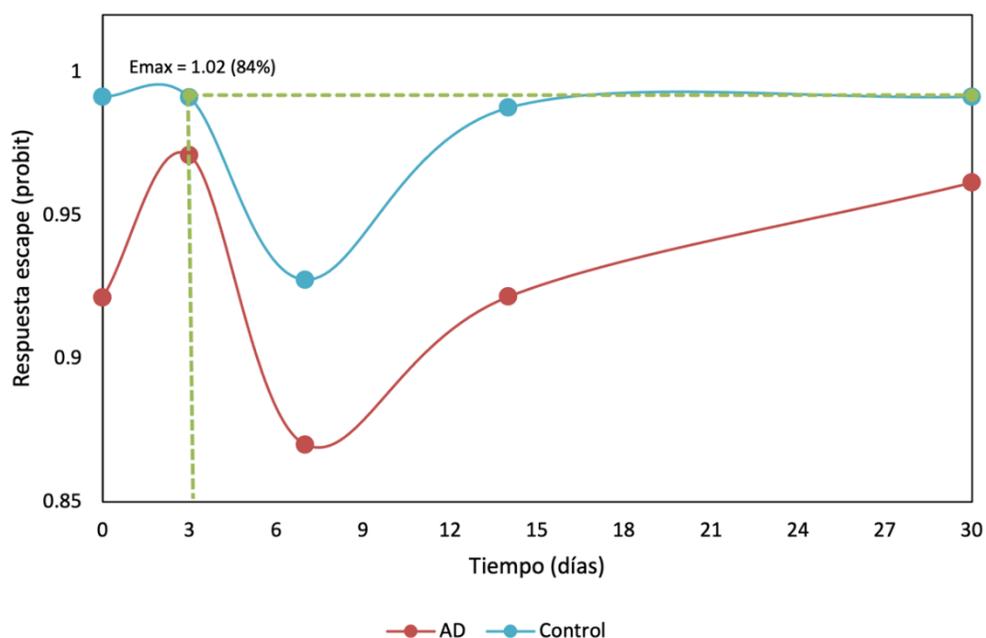
Para evaluar el efecto de la dieta-HC en la respuesta conductual (tiempo de escape ante un depredador), se realizó un análisis Probit considerando diferentes días de aplicación de la prueba. Los valores Probit obtenidos oscilaron entre 0.86 y 1.02 (Tabla 6, Figura 10), lo que equivale a probabilidades de respuesta del 80 al 84% aproximadamente.

**Tabla 6.** Valores transformados a escala Probit de la respuesta conductual en organismos tratados con ácido domoico (AD) y en el grupo control, en función del tiempo de tratamiento (días)

Tiempo (d)	Control	AD
0	0.9915	0.9214
3	0.9912	0.9710
7	0.9276	0.8700
14	0.9876	0.9217
30	0.9915	0.9615

**Tabla 7.** Valores estándar de la función Probit

	% de respuesta	Probit
EC50	50	0
EC60	60	0.25
EC70	70	0.52
EC80	80	0.84
EC90	90	1.28



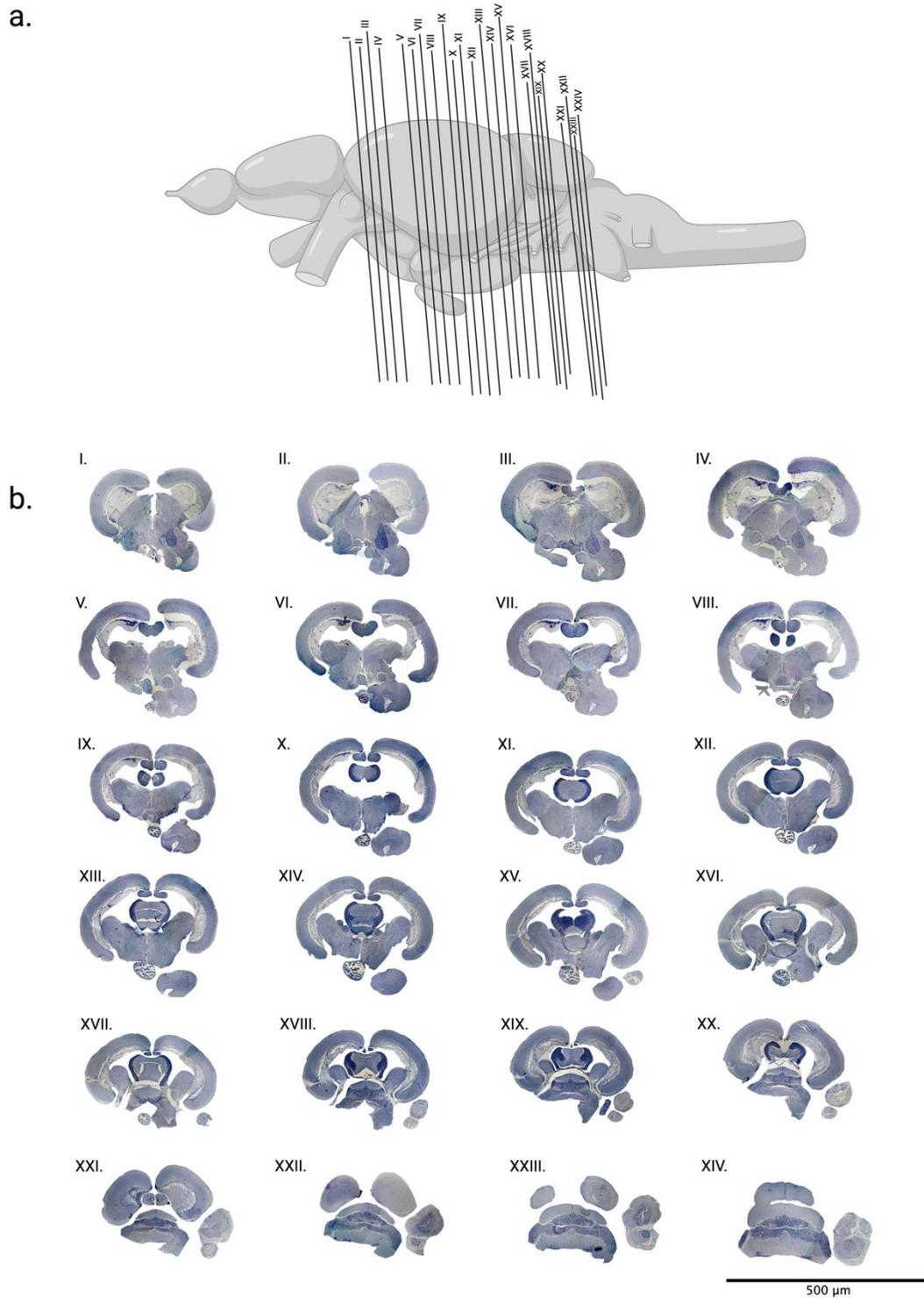
**Figura 10. Relación entre tratamiento con AD y respuesta conductual (Probit).** Correlación entre el tiempo de consumo de dieta-HC (días) y el probit del tiempo de escape frente a un depredador hipotético. La línea punteada (verde) indica el valor máximo observado ( $E_{max}=1.02$ ), correspondiente a un 84% de respuesta acumulada.

Dado que el valor probit correspondiente al 50% de respuesta es 0 (Effective Dose 50 o ED50), y este valor no fue alcanzado dentro del rango experimental, se concluye que el ED50 se encuentra fuera del intervalo de días evaluado. Esto sugiere que incluso con el mayor tiempo de exposición evaluado, más del 80% de los organismos presentaron una respuesta de escape positiva o un escape "rápido" lo que sugiere que no hay afectación en el reflejo de escape por el consumo de ácido domoico. Sin embargo, la diferencia entre las curvas permitió inferir el efecto modulador del ácido domoico sobre la capacidad de escape, evidenciando una menor eficiencia de respuesta en función del tratamiento (Fig. 10).

## **3.2 Evaluación de morfología cerebral en *Totoaba macdonaldi***

### **3.2.1 Organismo sano**

Se obtuvieron 24 imágenes de secciones transversales de cerebro de juveniles sanos de *Totoaba macdonaldi* (Fig. 11). Se realizó identificación de las principales regiones cerebrales (Anexo A).

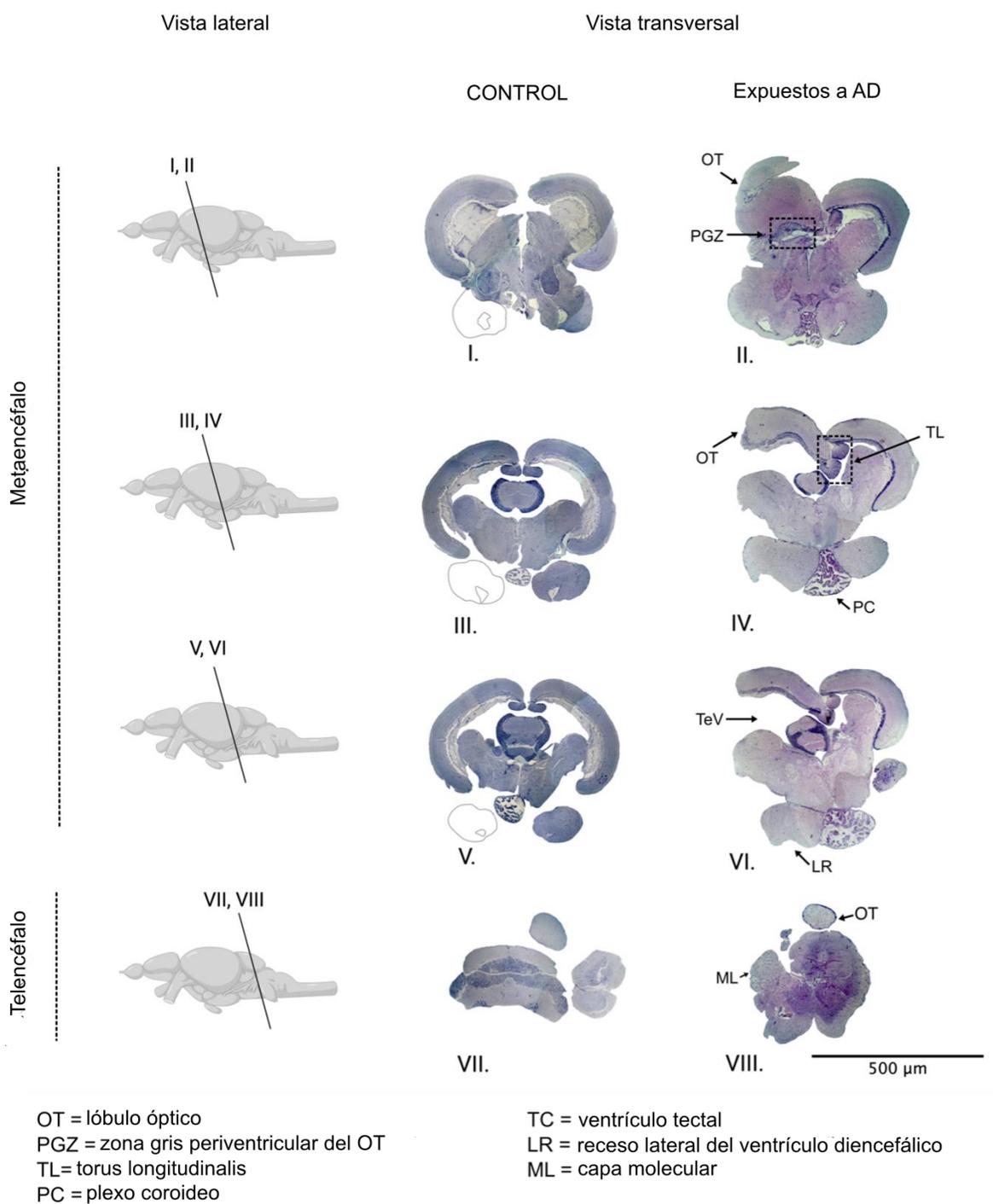


**Figura 11. Secciones transversales del cerebro sano de juvenil de *Totoaba macdonaldi* (a).** La vista lateral representa el plano general del cerebro de un teleosteo y se indica la posición de las secciones transversales mostrada en el panel (b). Las secciones transversales fueron etiquetadas arbitrariamente de la región cefálica a la región caudal del cerebro.

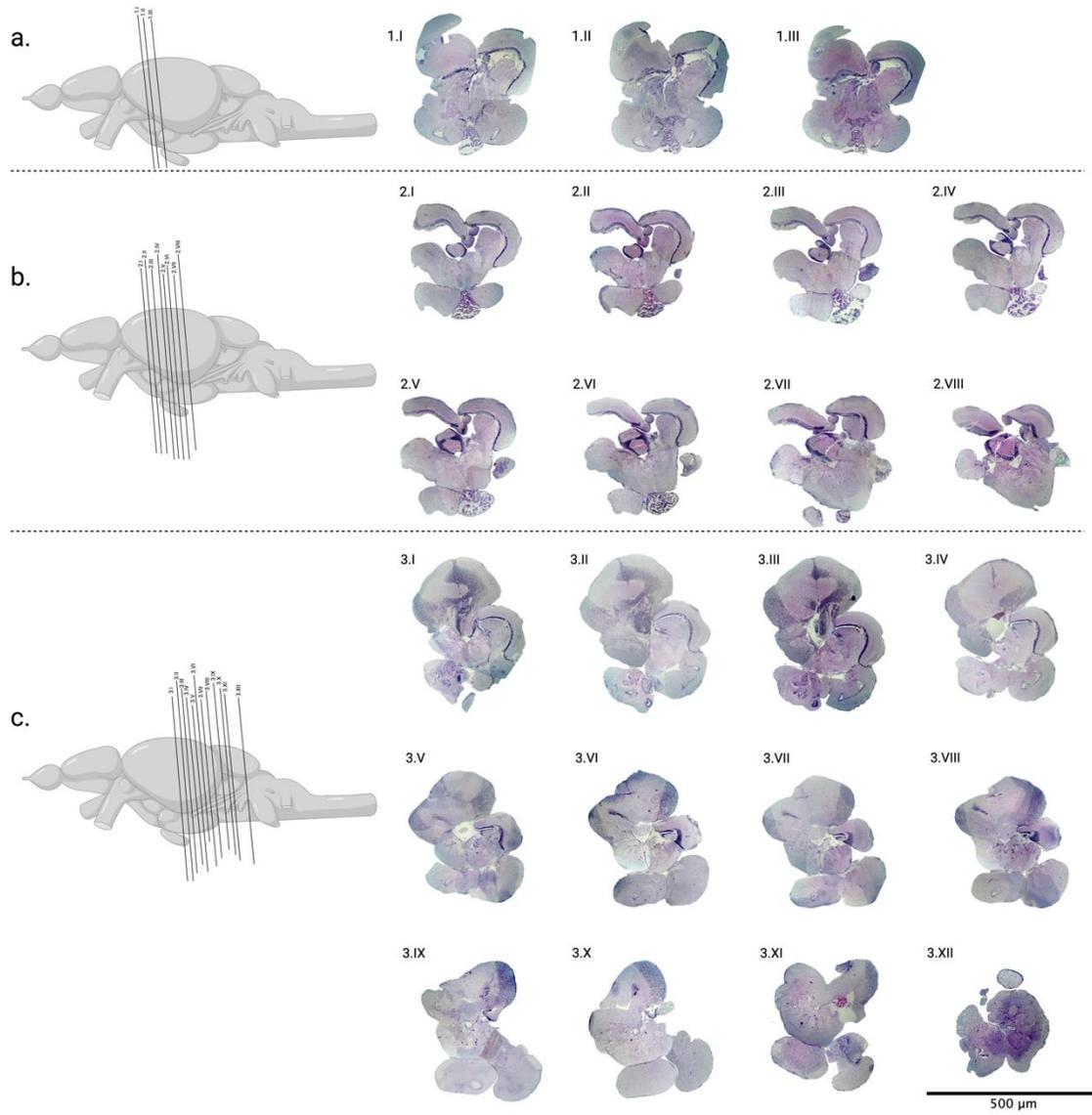
### 3.2.2 Peces expuestos al ácido domoico en alimento

Los juveniles de totoaba expuestos a la dieta-HC durante 45 días presentaron alteraciones notables en la morfología cerebral, además de las observadas a partir de los siete días de exposición. La alteración más evidente fue la pérdida de simetría bilateral en el plano sagital del cerebro, y en particular, se evidenciaron malformaciones en el hemisferio derecho del cerebro (Fig. 12; Fig. 13).

El mayor daño se presentó en la región mesencefálica, específicamente en el lóbulo óptico, el cual mostró un plegamiento externo y una reducción en la zona gris periventricular (Fig. 12.II). Otras alteraciones morfológicas evidentes inducidas por el AD en el mesencéfalo fueron el agrandamiento del plexo coroideo acompañado de la presencia de células sanguíneas en esta estructura (Fig. 5.IV; 12.VI), apertura del ventrículo tectal, y la ruptura del receso lateral del ventrículo diencefálico (Fig. 12.VI). También se observó una reducción en la superficie del lóbulo óptico con respecto a cerebros no afectados (Fig. 12.IV-12VI), estos cambios en la morfología estuvieron acompañados por pérdida de integridad del *torus longitudinalis* y *torus semicircularis* y un desplazamiento de estas estructuras hacia la parte interna del hemisferio opuesto. En la región telencefálica de los peces expuestos al AD se observaron alteraciones en la morfología del *corpus cerebelli* se observó una forma circular de esta estructura, un desplazamiento de la región caudal del lóbulo óptico hacia la parte superior del órgano, y un plegamiento externo de la capa molecular del lóbulo óptico (Fig. 12.VII;12.VIII), mientras que en los organismos no expuestos el *corpus cerebelli* presentó una forma elongada (Fig. 12.VII)



**Figura 12.** Comparación entre cerebro de individuos de *Totoaba macdonaldi* sanos e individuos de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dieta con ácido domoico (AD). La vista lateral representa el patrón general del cerebro de teleósteos y la localización de las secciones transversales presentadas del lado derecho de la figura se indica con números romanos.



**Figura 13.** Vista lateral del cerebro de *Totoaba macdonaldi* en tres individuos (a, b, c) expuestos al alimento con ácido domoico. Secciones transversales (1.I-III, 2.1-VIII, 3.I-XII).

### 3.3

## 3.4 Evaluación del efecto del alimento balanceado con ácido domoico en un modelo mamífero

### 3.4.1 Comportamiento

Los organismos que recibieron las dietas experimentales mostraron signos evidentes de intoxicación. Ambos grupos presentaron signos 15 minutos después del primer consumo de los pellets contaminados con ácido domoico. Los signos se caracterizaron por hiperactividad, sed excesiva, acicalamiento agresivo, somnolencia y pérdida del equilibrio. Los organismos del grupo que recibió la dieta DA-300 mostraron una aparente recuperación dos horas después del consumo inicial, aunque a los 14 días presentaron signos de agresión que se revirtieron en un período de 4 horas. En cambio, el grupo que recibió la dieta AD-800 murió 24 horas después del consumo inicial. Grupo control no mostró alteraciones conductuales.

### 3.4.2 Contenido de ácido domoico en harinas de pescado

En las sardinas frescas no hubo niveles detectables de AD, sin embargo, en el material cocido, en la harina y en el alimento elaborado si estuvo presente la toxina ( $0.37\text{-}1.64 \mu\text{gDA g}^{-1}$ ), por lo tanto, no fue posible obtener una verdadera dieta control (Tabla 8)

**Tabla 8.** Concentración de ácido domoico ( $\mu\text{gDA g}^{-1}$ ) en harina de pescado y alimentos.

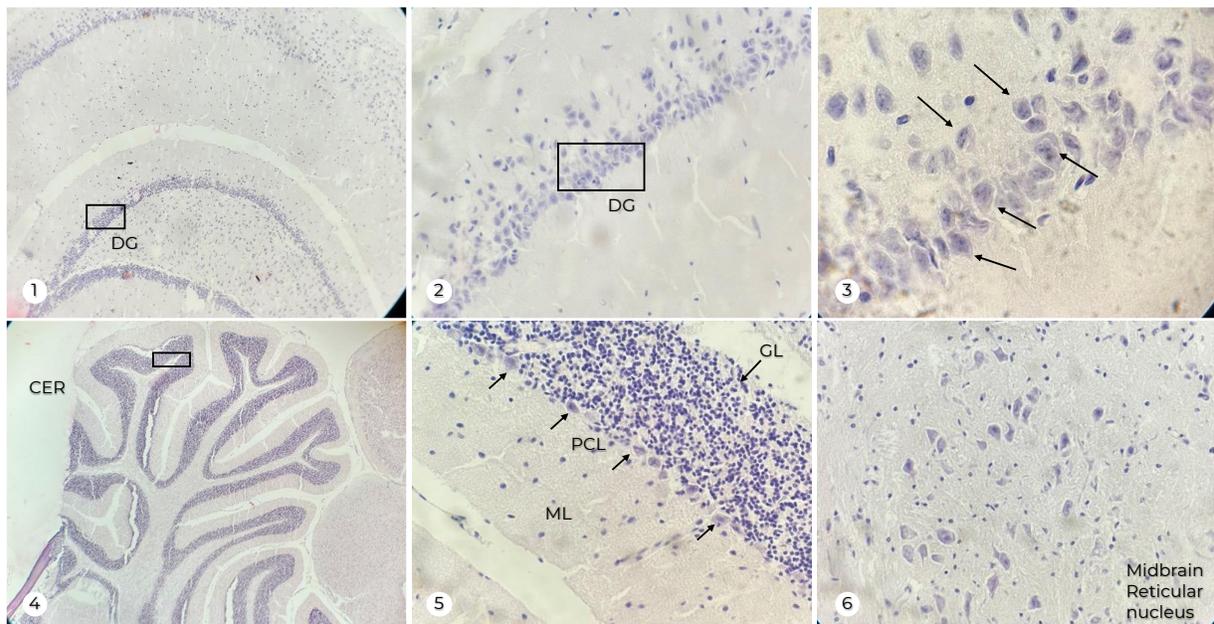
Material crudo	Material cocido	Harina	Dieta
0	$0.49 \pm 0.17$	$0.37 \pm 0.06$	1.64
339.56	$75.11 \pm 0.65$	$2.32 \pm 2.40$	2.92
513.14	$11.64 \pm 1.15$	$11.28 \pm 11.01$	5.05
857.86	$20.44 \pm 13.37$	$394.79 \pm 391.53$	7.32

### 3.4.3 Contenido de ácido domoico en órganos de ratón

En el grupo de ratones control y en el grupo con alimento AD-300 no se detectó AD en sus órganos. Sin embargo, en el cerebro del grupo alimentado con la dieta AD-800 se detectó una concentración de  $0.0028 \mu\text{gDA g}^{-1}$ .

### 3.4.4 Análisis histológico

Las preparaciones de tejidos del cerebro mostraron lesiones por intoxicación de AD en las neuronas del giro dentado del hipocampo, indicando necrosis oncótica en etapa de cariorrexis representada por núcleos celulares fragmentados (Fig. 14;1-3). El cerebelo no mostró alteraciones en capa molecular o granular (Fig.14;4) ni en células de Purkinje (Fig.14;5). Las neuronas del núcleo reticular del mesencéfalo tampoco presentaron daños (Fig.14;6).

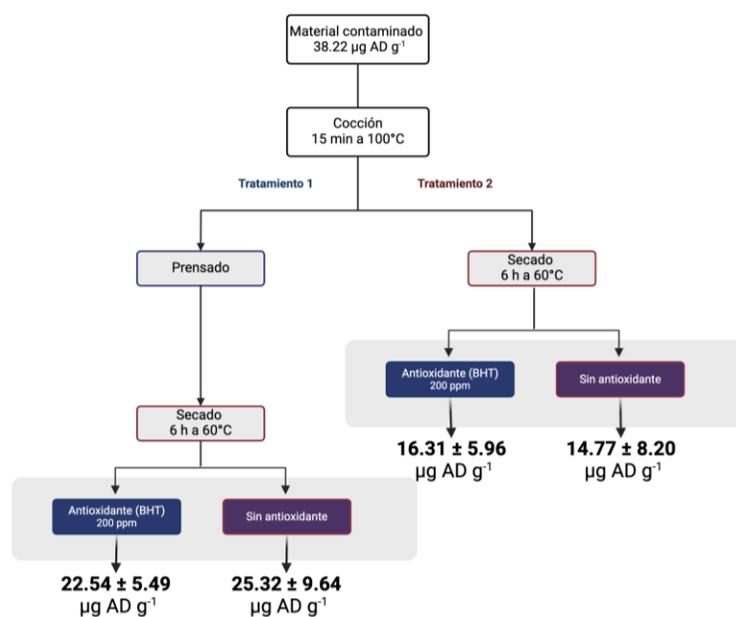


**Figura 14. Daño tisular en cerebro de ratón por consumo de alimento con ácido domoico.** 1) Hipocampo 2) Giro dentado. Acercamiento a la región indicada con un rectángulo en panel 1. 3) Acercamiento a neuronas en el giro dentado. Neuronas son núcleo fragmentado (flechas) 4) Cerebelo 5) Detalle de capas del cerebelo GL: capa granular, PCL: capa de células de Purkinje, ML: capa molecular. Sin daño tisular. 6) Núcleo reticular del mesencéfalo (midbrain) con neuronas con morfología normal.

### 3.5 Permanencia del ácido domoico (AD) en diferentes preparaciones de harina de pescado

#### 3.5.1 Concentración de ácido domoico en harinas de pescado

Se detectaron concentraciones de AD en las harinas de pescado de todos los tratamientos (Fig. 15), con las mayores las concentraciones en las harinas del tratamiento I, con paso intermedio de prensado para la eliminación de líquidos, con respecto al tratamiento II de secado directo.



**Figura 15.** Concentración de ácido domoico en harinas de pescado elaborados bajo dos tratamientos distintos.

## Capítulo 4.      Discusión

---

En el presente trabajo se demostró que el ácido domoico consumido a través del alimento afecta el cerebro y corazón de juveniles de totoaba y lobina rayada, así como alteró la conducta exploratoria y la respuesta de escape ante un depredador en *Totoaba macdonaldi* en condiciones de cultivo. El efecto no se limitó a daño tisular, también se observaron cambios morfológicos evidentes en el cerebro en los organismos expuestos al AD.

Aunque en la literatura se había establecido que los peces no eran afectados por el AD adquirido por vía oral, es conocido que son susceptibles a la toxina (Lefebvre et al., 2001; Lefebvre et al., 2002; Lefebvre et al., 2007), la administración por vía intraperitoneal (IP) causa alteraciones en la forma de nadar de especies como el salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*), en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la dorada (*Sparus aurata*) (Lefebvre et al., 2007; Bakke et al., 2010; Nogueira et al., 2010), e incluso causa la muerte en anchovetas norteñas (*Engraulis mordax*) expuestas a una dosis  $\geq 4.3 \mu\text{gDA g}^{-1}$  (Lefebvre et al., 2001). Las alteraciones conductuales evidentes observadas en totoaba luego de la exposición por vía IP indican que la toxina atraviesa la barrera hematoencefálica (Beltrán-Solis, 2021).

Debido a que el AD alcanza el cerebro y permanece en el cerebro, se espera que cause afectaciones en regiones específicas. Sin embargo, hasta ahora no se habían descrito alteraciones en el tejido cerebral en ninguna especie de pez luego de la exposición al AD. En el presente estudio se documentaron lesiones importantes en el tejido cerebral y cardíaco en juveniles de totoaba al ser expuestos al alimento con AD, efectos comparables en otros vertebrados como el descrito en humanos (Lefebvre et al., 2010), lobos marinos de california (Scholin et al., 2000), nutrias (Miller et al., 2021) y focas (Lefebvre et al., 2010; McHuron et al., 2013). El hipocampo es el área del cerebro con la mayor cantidad de receptores de glutamato a los que el AD se puede unir con gran afinidad (Pulido, 2008). Sin embargo, el hipocampo es una región que en el cerebro de los peces no se encuentra desarrollada, ya que forma parte del lóbulo temporal que es una extensión del neocórtex (corteza cerebral) que es un área del telencéfalo que únicamente se encuentra desarrollada en mamíferos (Striedter, 2006). En totoaba se identificó que la principal región blanco del AD se encuentra en el lóbulo óptico, lo que sugiere que posiblemente sea la región con mayor densidad de receptores de glutamato en el cerebro de los peces, lo que requerirá de otras investigaciones. En

el presente estudio y derivado de la alimentación con AD, se observó un daño tisular dado por vacuolización en la capa de células de Purkinje en el cerebelo, lo que no se ha descrito en otros organismos expuestos al AD por vía oral (Schaffer et al., 2016; Nogueira et al., 2010).

Además de la detección de lesiones tisulares en el cerebro por el consumo de alimento con AD, se observaron cambios morfológicos importantes en este órgano en totoaba como la pérdida de simetría bilateral con alteraciones estructurales localizadas en el hemisferio derecho. Estudios anteriores han encontrado alteraciones estructurales en otras áreas del cerebro con funciones importantes en el pez cebra (*Danio rerio*), como el plexo coroideo y el corpus cerebelli este último es una de las tres partes del cerebelo y es el sitio de entrada del tracto cerebeloso que transporta aferentes desde núcleos del tallo cerebral (Wullimann et al., 1996). El corpus cerebelli es una de las tres partes del cerebelo y es el sitio de entrada del tracto cerebeloso que transporta aferentes desde núcleos del tallo cerebral (Wullimann et al., 1996). En consecuencia, se espera que alteraciones en esta región pudieran causar daños a la coordinación motora de los organismos, como se observó en el presente estudio con totoaba. Por otra parte, el plexo coroideo es una estructura proyectada hacia los ventrículos cerebrales que secreta el líquido cefalorraquídeo y mantiene la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE), su disminución puede aumentar la susceptibilidad de los organismos a sustancias tóxicas del ambiente que al ingresar pueden afectar al sistema nervioso (Wullimann et al., 1986). El corpus cerebelli y el plexo coroideo son estructuras compartidas por muchos grupos de vertebrados, sin embargo, no existe evidencia que el AD afecte estas estructuras específicas en otro modelo animal.

Así como en el cerebro, el corazón de los juveniles de totoaba expuestos al AD presentó lesiones similares a las descritas anteriormente, esto debido a que los receptores de glutamato pueden encontrarse también en el tejido cardíaco (Gill et al., 1998), lesiones como necrosis en cardiomiocitos y separación entre fibras musculares ha sido descrita en lobos marinos (Scholin et al., 2000) y nutrias (Miller et al., 2019), estas lesiones fueron observadas en el corazón de totoaba luego de la exposición al AD. Además, se observó melanismo focal en el atrio de las totoabas expuestas a la toxina. El melanismo se caracteriza por la presencia de melanomacrófagos, que son células incorporadas a lugares con inflamación crónica en vertebrados ectotermos (Agius et al., 1981; Bjorgen et al., 2021; Wakamatsu et al., 2002), lo que sugiere un proceso inflamatorio inducido por el consumo de AD en el corazón de peces.

Además de la descripción por primera vez del daño tisular en el cerebro y corazón asociado al consumo de alimento con AD en totoaba, se documentó también alteraciones conductuales en juveniles de totoaba expuestos a la toxina. Los organismos rechazaron el alimento contaminado con AD luego de 45 días de haberlo consumido de manera regular. El rechazo de alimento contaminado con ficotoxinas no es un evento anormal, ya que ha sido reportado en nutrias al rechazar alimento con saxitoxina (Wakamatusu et al., 2002), además, en peces como la trucha arcoíris (*Salmo gairdneri*) y en la trucha alpina (*Salvelinus alpicus*) (Yamamori et al., 1988). De forma similar, organismos de jurel medregal (*Seriola rivoliana*) rechazaron alimento contaminado con ácido okadaico (Benitez-Hernández et al., 2022). Sin embargo, la detección o rechazo de alimento contaminado con AD no ha sido reportada en otros organismos.

Otras alteraciones conductuales en juveniles de totoaba fueron evaluadas mediante el uso de pruebas conductuales estandarizadas, la prueba de luz/oscuridad fue utilizada para estudiar la ansiedad en peces y se basó en la preferencia natural por ambientes oscuros que muestran algunas especies de peces (Maximino et al., 2020; Serra et al., 1999; Yoshida et al., 2005; Maximino et al., 2007). De forma general, las drogas ansiolíticas incrementan el tiempo que un organismo pasa en el compartimento claro, mientras que las drogas ansiogénicas disminuyen este tiempo (Sandoval-Herrera et al., 2019). Sin embargo, la totoaba en cultivo muestra preferencia por ambientes oscuros. Ya que la totoaba es un organismo depredador carnívoro, el lado claro del acuario representa un ambiente donde pudiera encontrar alimento y dado a que los organismos utilizados en el experimento provienen de cultivo, es probable que no estuvieran acostumbrados a la búsqueda de refugio. La ansiedad en peces se caracteriza por comportamientos de inmovilidad, ocultarse o un incremento del movimiento, defecación y tigmotaxis (Miletto et al., 2020). En el presente estudio la conducta exploratoria fue gravemente afectada (incremento en el número de eventos de congelamiento y menor conducta exploratoria) sugiere que el AD imita el efecto o actúa como una droga ansiogénica. Por otra parte, la respuesta de escape en peces es una conducta evasiva mediada por neuronas que reciben estímulo vibracional y muestran contracción muscular como respuesta (Sandoval-Herrera et al., 2019; Hope et al., 2019). Debido a que el lóbulo óptico y el cerebelo fueron afectados, y al ser dos de los centros integrativos para la coordinación motora en el sistema nervioso de peces la respuesta de escape fue consecuentemente afectada por el consumo de alimento con AD. En otros estudios y con varias especies de vertebrados se reporta un patrón general de lateralización en diferentes especies, siendo el hemisferio derecho especializado en controlar la

conducta social, respuesta a estímulos inesperados (ej. depredadores) y procesar información global (Miletto et al., 2020; Domenici et al., s.f.). Las lesiones observadas en el hemisferio derecho del cerebro en los juveniles de totoaba están probablemente relacionadas con la reducción en la respuesta de escape a un depredador hipotético considerando a la totoaba como una especie con cerebro lateralizado.

Aunque los peces no muestran los signos típicos de intoxicación por AD como aquellos observados en aves y mamíferos marinos (McHuron et al., 2013; Tryphonas et al., 1990; Zabka et al., 2009), este estudio sugiere que existen efectos subyacentes que pueden impactar la salud de los organismos. En el presente estudio se demostró que la totoaba es afectada por el AD adquirido a través de la ingesta de la toxina en el alimento. Aunque la susceptibilidad al AD podría ser especie-específica, el hecho de que los peces sean susceptibles a la toxina adquirida a través de una ruta ecológicamente relevante podría tener importantes implicaciones ecológicas al alterar las interacciones depredador-presa al convertir a un organismo naturalmente depredador en presa fácil de organismos de mayor tamaño. Es preciso investigar cómo puede afectar el AD al bienestar de los peces.

La harina de pescado es un producto que tiene altos niveles de ácidos grasos esenciales, especialmente de tipo omega-3 que son ácidos grasos insaturados de cadena larga (Cho et al., 2010). Por su estructura molecular los ácidos grasos son propensos a la oxidación, poseen en su estructura una cadena de carbonos que presenta múltiples dobles enlaces los cuales son sitios reactivos susceptibles a la oxidación (Wang et al., 2023). La pérdida de ácidos grasos en la harina de pescado es crítica desde la perspectiva de nutrición animal, por lo que, durante la elaboración de la harina se utilizan antioxidantes para estabilizar el producto final (FAO, 2019). Sin embargo, el ácido domoico comparte similitudes estructurales con los ácidos grasos como son la presencia de un grupo carboxilo y una cadena de carbonos. La cadena de carbonos del AD contiene un doble enlace, lo que lo hace propenso a la oxidación, y por esto, existe la posibilidad de que el uso de antioxidantes para evitar la pérdida de ácidos grasos favorezca la permanencia del AD en la harina. Sin embargo, en los resultados no se observan diferencias importantes entre la concentración de ácido domoico entre las muestras con y sin antioxidante añadido en cada tratamiento. Lo que sugiere que los antioxidantes no tienen un efecto en la permanencia del ácido domoico en el producto final.

Por otra parte, el AD al contener únicamente un doble enlace (ácido insaturado) es menos propenso a la oxidación al compararlo con los ácidos grasos que contienen múltiples dobles enlaces (ácidos poliinsaturados)(Cabrera et al., 2020). Por lo anterior, se esperaría que las harinas del tratamiento en el cual no se eliminaron los líquidos y/o aceites (Tratamiento 2), tuvieran una mayor concentración de ácido domoico al contener una mayor cantidad de lípidos (ácidos grasos) más propensos a la oxidación que el AD. Sin embargo, se observa que hay una mayor concentración de ácido domoico en las harinas del tratamiento 1 en el cual se eliminaron los líquidos y/o aceites lo que resulta de forma contraria a lo esperado. Esto sugiere que no existe correlación entre los niveles de ácidos grasos y la permanencia del ácido domoico en las harinas. Sin embargo, estas observaciones deben ser comprobadas a través del análisis de contenido de lípidos de la harina de cada tratamiento para determinar si existe una correlación entre cantidad de lípidos y presencia de ácido domoico.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

La totoaba y lobina rayada, peces teleósteos carnívoros, son susceptibles al ácido domoico (AD) tanto por vía intraperitoneal como por vía oral. Aunque la exposición oral al AD no desencadenó respuestas conductuales estereotipadas evidentes, si generó daños tisulares significativos en el cerebro y el corazón de los organismos.

Las dosis utilizadas en los experimentos no generaron conductas estereotipadas, pero la exposición al AD si resultó en alteraciones conductuales que pueden tener implicaciones ecológicas. En particular, en la totoaba, el AD induce alteraciones morfológicas notables en el cerebro, evidenciando su efecto neurotóxico incluso sin manifestaciones conductuales estereotipadas.

El AD resiste el proceso de elaboración de harina de pescado, lo que implica que la toxina puede estar presente en los productos finales destinados a la alimentación animal o humana.

## Literatura citada

- Agius, C. (1981). Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haemopoietic tissues and age-related changes. *Developmental & Comparative Immunology*. 5, 597-606. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(81\)80034-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(81)80034-1)
- Bakke, M., Hustoft, H. & Horsberg, T. (2010). Subclinical effects of saxitoxin and domoic acid on aggressive behavior and monoaminergic turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 99, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.03.013>
- Bates, S., Bird, C., de Freitas, W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L., Johnson, G., ..., Wright, J. (1989). Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 46, 1215-1230. <https://doi.org/10.1139/f89-156>
- Beltrán-Solis, K. (2021). *Determinación del daño en tejidos y modificación del comportamiento por efecto del ácido domoico en Totoaba macdonaldi*. [Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Baja California.]. Repositorio institucional. <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/entities/publication/abb19a9b-5880-433b-9d5b-5129285d782c>
- Benitez-Hernández, A., Palacios, E., Núñez-Vázquez, E., García-Mendoza, E., Arjona, O. & Civera-Cerecedo, R. (2021). Marine by-products tested as feed for Almaco Jack *Seriola rivoliana* and their effect on fatty acids and sterols in different tissues. *Waste and Biomass Valorization*. 13, 1945-1963. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01638-0>
- Bjorgen, H. (2021). *Melanized focal muscle changes in Atlantic salmon-Interactions between infection and immunity*. [Tesis doctoral. Norwegian University of Life Sciences]. Doctoral Theses (VetMed) <https://hdl.handle.net/11250/2988344>
- Cho, J.H. & Kim, H. (2010). Fish meal-nutritive value. *Animal Physiology and Animal Nutrition*. 92, 685-692. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01109.x>
- Domenici, P. (2011). *Buoyancy, locomotion, and movement in fishes*. *Encyclopedia of Fish Physiology*. Elsevier Academic Press.
- Food and Agriculture Organization of the United States. (2001). *Elaboración y distribución de alimentos para peces*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado de <https://www.fao.org/4/ab482s/AB482S10.htm>
- Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3<sup>rd</sup> ed). Cambridge University Press.
- Fire, S., Wang, Z., Berman, M., Langlois, G., Morton, S., Sekula-Wood, E. & Benitez-Nelson, C. (2010). Trophic transfer of the harmful algal toxin domoic acid as a cause of death in a Minke Whale (*Balaenoptera acutorostrata*) stranding in southern California. *Aquatic Mammals*. 36, 342-250. <https://doi.org/10.1578/AM.36.4.2010.342>

- Fritz, L., Quilliam, M., & Wright, J. (1992). An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudo-nitzschia australis*. *Journal of Phycology*. 28, 439-442. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1992.00439.x>
- Gajski, G., Geric, M., Baricevic, A. & Smodlaka, M. (2024). Domoic acid: A review of its cytogenotoxicity within the One Health approach. *Antioxidants*. 13(11), 1366 <https://doi.org/10.3390/antiox13111366>
- Gill, S. S., Pulido, O. M., Mueller, R. W., & McGuire, P. F. (1998). Molecular and immunochemical characterization of the ionotropic glutamate receptors in the rat heart. *Brain Research Bulletin*, 46(5), 429–434. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(98\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(98)00012-4)
- Hardy, R., Scott, T., Hatfield, C., Barnett, H., Gauglitz, E., Wekell, J. & Eklund, M. (1995). Domoic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feeds. *Aquaculture*. 131, 253-260. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00335-L](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00335-L)
- Hope, B., Hamilton, T. & Hurd, P. (2019). Submerged plus maze: a novel test for studying anxiety-like behavior in fish. *Behavioral Brain Research* 19, 332-337. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.12.012>
- Kvitek, R., DeGunge, A. & Beitler, M. (1991). Paralytic shellfish poisoning toxins mediate feeding behavior of sea otters. *Limnology and Oceanography*. 36, 393-404. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.2.0393>
- Lefebvre, K., Dovel, S. & Silver, M. (2001). Tissue distribution and neurotoxic effects of domoic acid in a prominent vector species, the northern anchovy *Engraulis mordax*. *Marine Biology*. 138, 693-700. <https://doi.org/10.1007/s002270000509>
- Lefebvre, K. & Robertson, A. (2010). Domoic acid and human exposure risks: a review. *Toxicol.* 56, 218-230. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.05.034>
- Lefebvre, K., Silver, M., Coale, S. & Tjeerdema, R. (2002). Domoic acid in planktivorous fish in relation to toxic *Pseudo-nitzschia* cell densities. *Marine Biology*. 140, 625-631. <https://doi.org/10.1007/s00227-001-0713-5>
- Lefebvre, K., Frame, R. & Kendrick, P. (2012). Domoic acid and fish behavior: a review. *Harmful Algae*. 36, 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.09.011>
- Lefebvre, K., Noren, D., Schultz, I., Bogard, S., Wilson, J. & Bich-Thuy, L. (2007). Uptake, tissue distribution and excretion of domoic acid after oral exposure in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*. 81, 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.12.009>
- Lefebvre, K., Robertson, A., Frame, E., Colegrove, K., Nance, S., Baugh, K., Wiedenhof, H. & Gulland, F. (2010). Clinical signs and histopathology associated with domoic acid poisoning in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and comparison of toxin detection methods. *Harmful Algae*. 4, 374-383. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.01.007>
- Mafra, L., Léger, C., Bates, S. & Quilliam, M. (2009). Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization, using UV or mass

- spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 1216, 6003-6011. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.050>
- Maximino, C., Marques de Brito, T., Gellis de Maytos, C., Gouveia, A. & Morato, S. (2010). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*. 5, 209-216. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.225>
- Maximino, C., de Brito, T. M., de Moraes, F. D., de Oliveira, F. V. C., Taccolini, I. B., Pereira, P. M., Colmanetti, R., ..., Gouveia, A., Jr. (2007). A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. *International Journal of Comparative Psychology*, 20(4), 351–367. <https://doi.org/10.46867/ijcp.2007.20.04.02>
- McHuron, E., Greig, D., Colegrove, K., Fleetwood, M., Spraker, T., Gulland, F., ..., Frame, E. (2013). Domoic acid exposure and associated clinical signs and histopathology in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardii*). *Harmful Algae*. 23, 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.12.008>
- Miletto, M., Sovrano, V., Vallortigara, G. & Messina, A. (2020). Brain and behavioral asymmetry: a lesson from fish. *Frontiers Neuroanatomy*. 14, 1-22. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00011>
- Miller, M., Moriarty, M., Duignan, P., Zabka, T., Dodd, E., Batac, F., Young, C., Reed, A., ..., Toy-Choutka, S. (2021). Clinical signs and pathology associated with domoic acid toxicosis in Southern Sea Otters (*Enhydra lutris nereis*). *Frontiers in Marine Science*. 8, 585501. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.585501>
- Muñoz-Cueto, J., Sarasquete, C., Zohar, Y. & Kah, O. (2001). *An Atlas of the Brain of the Gilthead Seabream (Sparus aurata)*. Maryland Sea Grant.
- Nogueira, I., Lobo-da-Cunha, A., Afonso, A., Rivera, S., Azevedo, J., Monteiro, R., Cervantes, R., Gago-Martinez, A. & Vasconcelos, V. (2010). Toxic effects of domoic acid in the seabream *Sparus aurata*. *Marine Drugs*. 8, 2721-2732. <https://doi.org/10.3390/md8102721>
- Petroff, R., Hendrix, A., Shum, S., Grant, KS., Lefebvre, KA. & Burbacher, TM. (2021). Public health risks associated with chronic, low-level domoic acid exposure: A review of the evidence. *Pharmacology and Therapeutics*. 227, 107865. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107865>
- Petroff, R., Richards, T., Crouthamel, B., McKain, N., Stanley, C., Grant, K., Shum, S., ..., Burbacher, T. (2019). Chronic, low-level exposure to marine toxin, domoic acid, alters whole brain morphometry in nonhuman primates. *Neurotoxicology*. 72, 114-124. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.02.016>
- Pulido, O. (2008). Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Marine Drugs*. 6, 180-219. <https://doi.org/10.3390/md20080010>
- Ramsdell, J. (2007). The molecular and integrative basis to domoic acid toxicity. In *Phycotoxins*. <https://doi.org/10.1002/9780470277874.ch13>

- Sandoval-Herrera, N., Mena, F., Espinoza, M. & Romero, A. (2019). Neurotoxicity of organophosphate pesticides could reduce the ability of fish to escape predation under low doses of exposure. *Scientific Reports*. 19, 10530. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46804-6>
- Scarborough, J., Mueller, F., Arban, R., Dorner-Ciossek, C., Weber-Stadlbauer, U., Rosenbrock, H., Meyer, U. & Richetto, J. (2020). Preclinical validation of the micropipette-guided drug administration (MDA) method in the maternal immune activation model of neurodevelopmental disorders. *Brain Behavior and Immunity*. 88, 46-470. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.015>
- Scholin, C., Gulland, F., Doucette, G., Benson, S., Busman, M., Chavez, F., Cordaro, J., ..., Van Dolah, F. (2000). Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*. 403, 80-84. <https://doi.org/10.1038/47481>
- Serra, E., Medalha, C. & Mattioli, R. (1999). Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32, 151-3. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999001200016>
- Sierra-Beltrán, A., Palafox-Urbe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A. & Ochoa, J. (1997). Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon*. 35, 447-453. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00140-7)
- Wakamatsu, K. & Shosuke, I. (2002). Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment cell Research*. 15, 174-183. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.02017.x>
- Wang, D., Xiao, H., Lyu, X., Chen, H. & Wei, F. (2023). Lipid oxidation in food science and nutritional health: A comprehensive review. *Oil Crop Science*, 8(1), 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2023.02.002>
- Work T., Barr, B., Beale, M., Fritz, L. & Quilliam, M. (1993). Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 24, 54-62. <http://www.jstor.org/stable/20460314>
- Wullimann, M.F., Rupp, B. & Reichert, H. (1996). Neuroanatomy of the Zebrafish brain: A topological atlas. Birkhäuser Basel. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8979-7>
- Yamamori, K., Nakamura, M., Matsui, T. & Hara, T. (2011). Gustatory responses to tetrodotoxin and saxitoxin in fish: a possible mechanism for avoiding marine toxins. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 45, 2182-2186. <https://doi.org/10.1139/f88-253>
- Yoshida, M., Nagamine, M. & Uematsu, K. (2005). Comparison of behavioral responses to a novel environment between three teleosts, bluegill *Lepomis macrochirus*, crucian carp *Carassius langsdorfii*, and goldfish *Carassius auratus*. *Fisheries Science*. 71, 314-319. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.00966.x>

Zabaglo, K., Chrapusta, E., Bober, B., Kaminski, A., Adamski, M. & Bialczyk J. (2016). Environmental roles and biological activity of domoic acid: A review. *Algal Research*. 13, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.020>

## Anexos

### Anexo A

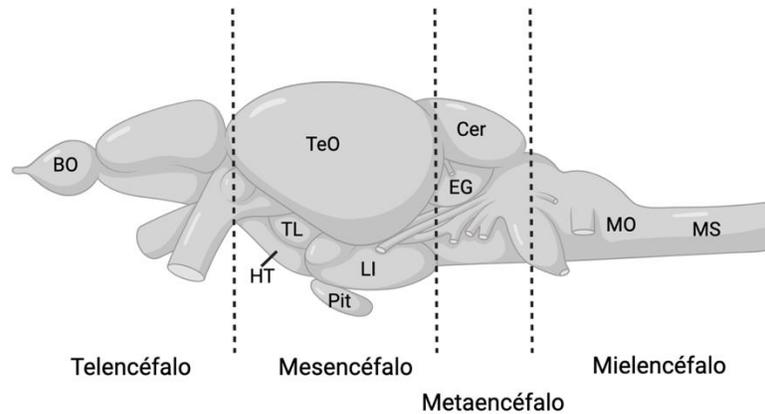
#### Atlas de neuroanatomía del cerebro de *Totoaba macdonaldi*

##### Histología

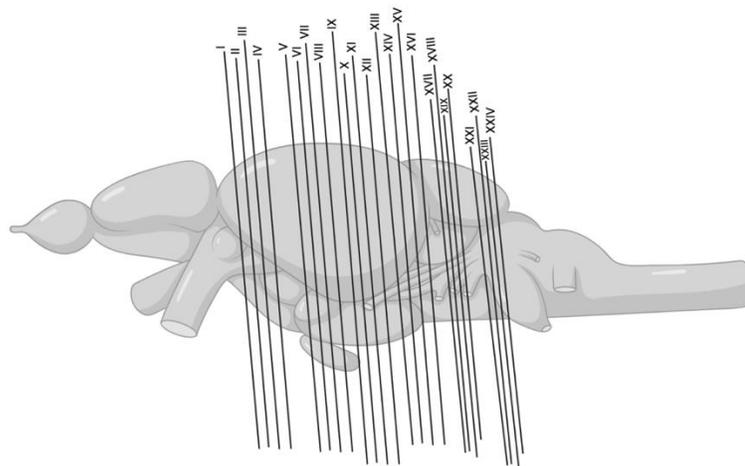
Se utilizaron 20 juveniles de *Totoaba macdonaldi* para la realización de este estudio. Los organismos se colocaron en agua fría para su aletargamiento y posteriormente se realizó eutanasia por corte de branquias. Los organismos fueron decapitados y el cráneo se abrió dorsalmente para exponer el cerebro. Los cerebros fueron removidos utilizando pinzas de disección y se colocaron en formol al 10% para su fijación durante un periodo de un mes previo a su procesamiento. Los órganos fueron deshidratados en una serie de alcoholes de graduación creciente y procesados por la técnica de inclusión en parafina. Se realizaron cortes transversales de 5  $\mu\text{m}$  del órgano completo y se obtuvieron 50 laminillas por cada cerebro. Las laminillas fueron teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina.

##### Preparación de figuras

Se seleccionaron tres series de laminillas (3 organismos) de cerebros de organismos sanos para documentación fotográfica. Utilizando edición en computadora se eliminaron artefactos y otras estructuras indeseadas, como el contenido ventricular. Las laminillas fueron analizadas utilizando un microscopio Leica DM2000 y con el Software Leica Acquire se obtuvieron 5 imágenes por cada laminilla. Las imágenes fueron compuestas en una sola figura utilizando BioRender ([www.bionrender.com](http://www.bionrender.com)). Las estructuras que se perdieron al extraer el cerebro de la cavidad craneal se representaron con líneas punteadas cuando fue necesario. Las figuras más representativas de cada serie fueron seleccionadas de acuerdo con la aparición de nuevas estructuras. Los números mostrados en cada figura del atlas representan el número de sección. Mientras que los números indicados en la Fig.3 se presentan arbitrariamente con la sección I. Se utilizó el libro *An Atlas of the Brain of the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*)* como referencia para la identificación de las regiones cerebrales en las ilustraciones de las secciones trasnversales.

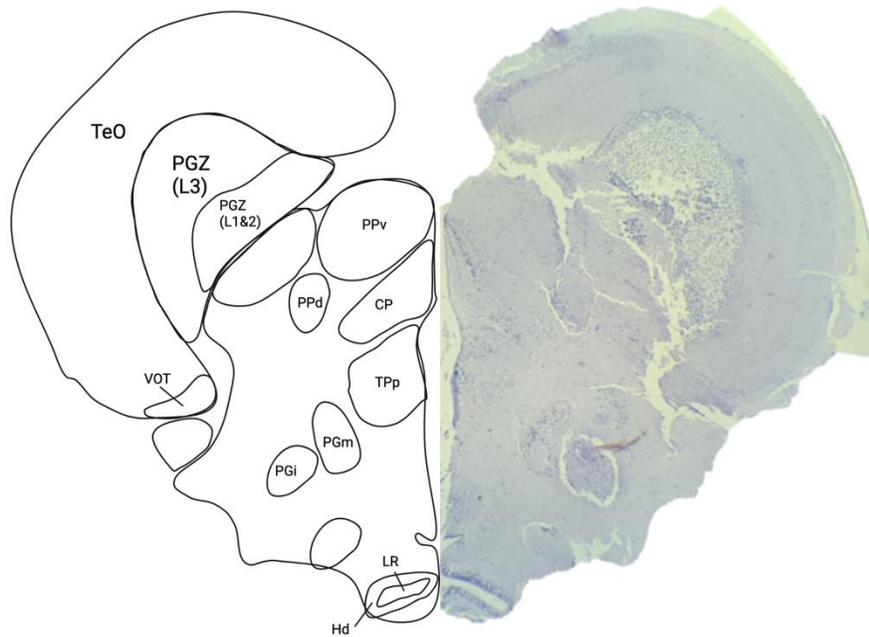


**Figura 16.** Vista lateral del plano general del cerebro de un pez teleosteo adulto. Se indican 4 regiones principales: telencéfalo, mesencéfalo, metaencéfalo y mielencéfalo. El telencéfalo consta del área telencefálica y un bulbo olfatorio (BO). El mesencéfalo comprende la parte media del cerebro y está cubierto casi en su mayoría por el tectum óptico (TeO) en la parte dorsal. La parte ventral consta de estructuras como torus longitudinalis (TL), pituitaria (Pit), hipotálamo tuberal (TL) y lóbulo inferior del hipotálamo (LI). El metaencéfalo alberga en la región ventral gran parte de los nervios craneales y se encuentra cubierto por el cerebelo (Cer) y eminencia granularis (EG). La medula oblongata (MO) localizada en el mielencéfalo se extiende hasta la medula espinal (medulla spinalis).



**Figura 17.** Vista lateral del cerebro de un pez teleosteo adulto indicando las posiciones de las secciones transversales ilustradas en la serie de imágenes de cortes seriados. Las secciones transversales en serie se etiquetaron arbitrariamente desde la región cefálica hasta la región caudal del cerebro.

### Cross section I



**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum óptico

**PPv** núcleo periventricular pretecal, parte ventral

**PPd** núcleo periventricular pretecal, parte dorsal

**CP** núcleo talámico central posterior

**TPp** núcleo periventricular del tuberculo posterior

**PGm** núcleo medial preglomerular

**PGi** núcleo lateral preglomerular

**LR** receso lateral del ventrículo diencefálico

**Hd** hipotálamo periventricular, zona dorsal

## Cross section II



**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum óptico

**TeV** ventrículo tectal

**VOT** tracto óptico ventrolateral

**TLa** torus lateralis

**CP** nucleo talámico central posterior

**TPp** núcleo periventricular del tuberculo posterior

**PGm** núcleo medial preglomerular

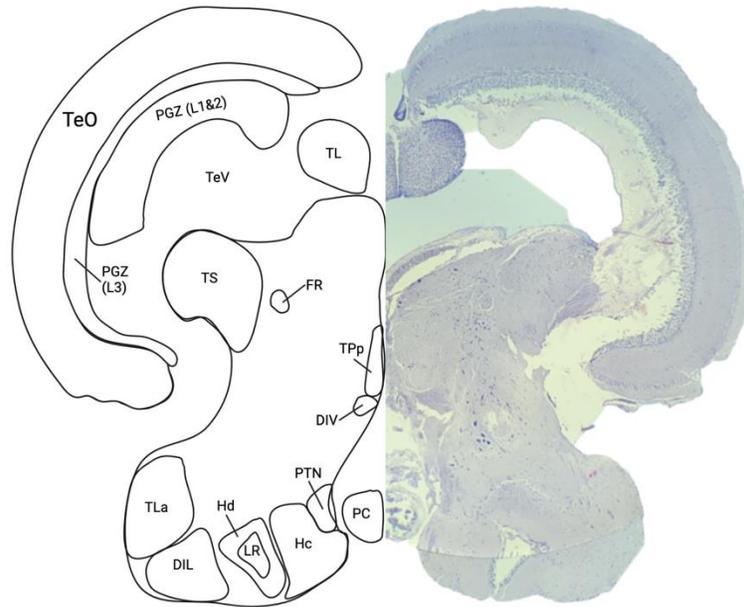
**PGi** núcleo lateral preglomerular

**Hd** hipotálamo periventricular, zona dorsal

**LR** receso lateral del ventrículo diencefálico

**ATN** núcleo anterior tuberal

## Cross section VII



**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum  
óptico

**TeV** ventrículo tectal

**TL** torus longitudinalis

**TS** torus semicircularis

**FR** fasciculus retroflexus

**Tpp** núcleo periventricular del tuberculo  
posterior

**Div** ventrículo diencefálico

**PC** plexo coroideo

**PTN** núcleo posterior tuberal

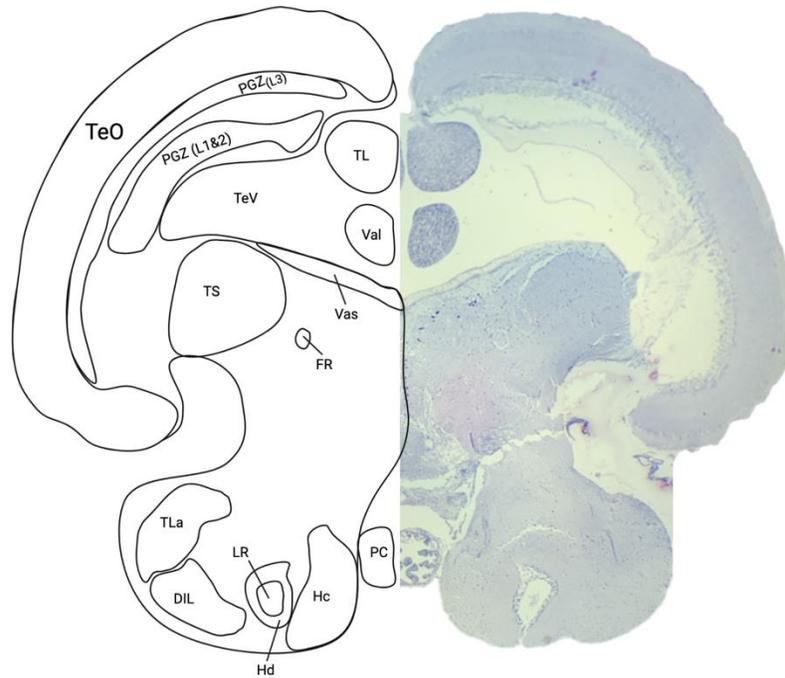
**Hc** hipotálamo periventricular, zona caudal

**Hd** hipotálamo periventricular, zona dorsal

**LR** receso lateral del ventrículo diencefálico

**DIL** núcleo difuso del lóbulo inferior

### Cross section VIII



**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum  
óptico

**TL** torus longitudinalis

**TeV** ventrículo tectal

**Val** division lateral de valvula cerebelli

**Vas** vascular lacuna de area postrema

**TSc** núcleo central del torus semicircularis

**FR** fasciculus retroflexus

**TLa** torus lateralis

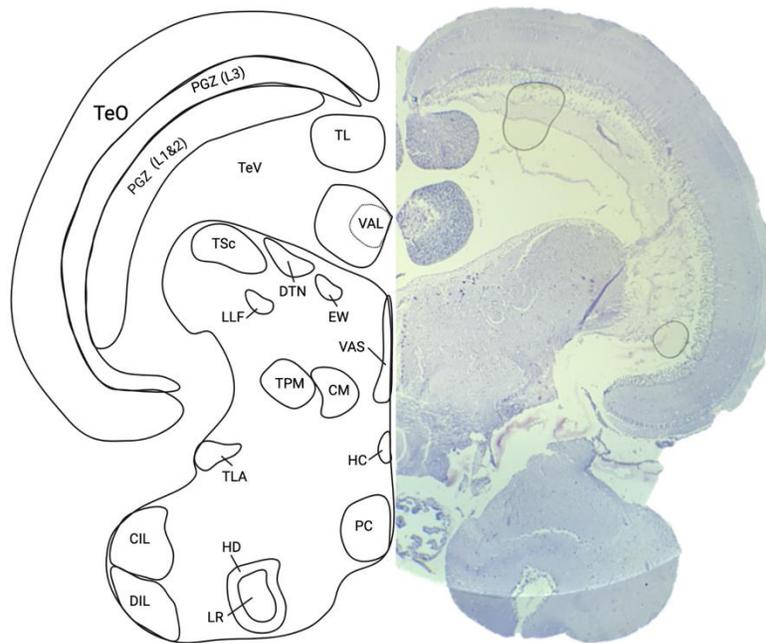
**DIL** núcleo difuso del lóbulo inferior

**LR** receso lateral del ventrículo diencefálico

**Hd** hipotálamo periventricular, zona dorsal

**PC** plexo coroideo

### Cross section IX



**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum  
óptico

**TL** torus longitudinalis

**Val** division lateral de valvula cerebelli

**TSc** núcleo central del torus semicircularis

**DTN** núcleo tegmental dorsal

**EW** núcleo Edinger-Westphal

**LLF** fascículo longitudinal lateral

**Vas** vascular lacuna de area postrema

**TPM** tractus pretectomamillaris

**CM** corpus mamillare

**Hc** hipotálamo periventricular, zona caudal

**TLa** torus lateralis

**CIL** núcleo central del lóbulo inferior

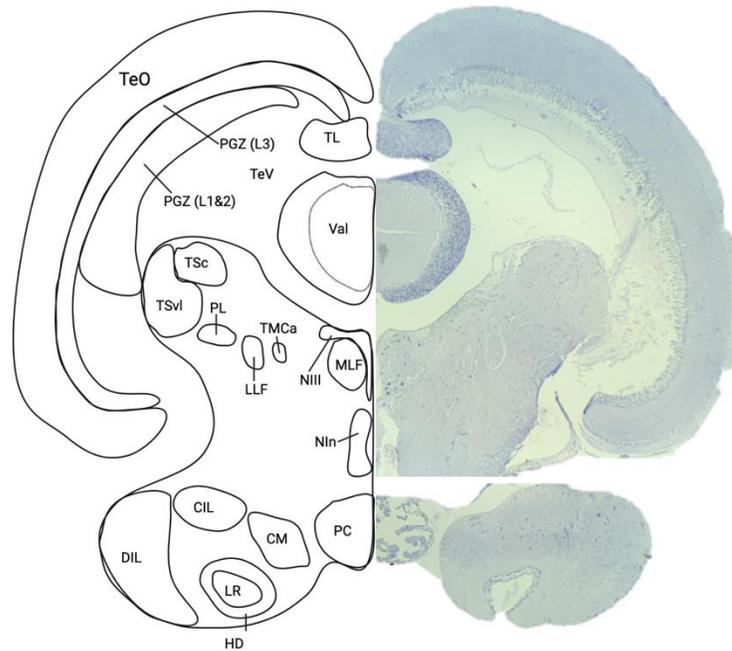
**DIL** núcleo difuso del lóbulo inferior

**Hd** hipotálamo periventricular, zona dorsal

**LR** receso lateral del ventrículo diencefálico

**PC** plexo coroideo

## Cross section XI



**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum óptico

**TL** torus longitudinalis

**Val** division lateral de valvula cerebelli

**TeV** ventriculo tectal

**TSc** núcleo central del torus semicircularis

**TSvl** núcleo ventrolateral de torus semicircularis

**PL** núcleo perilemniscal

**LLF** fascículo longitudinal lateral

**TMCa** tractus mesencephalocerebellaris anterior

**NIII** núcleo oculomotor

**Nin** núcleo interpeduncularis

**PC** plexo coroideo

**CM** corpus mamillare

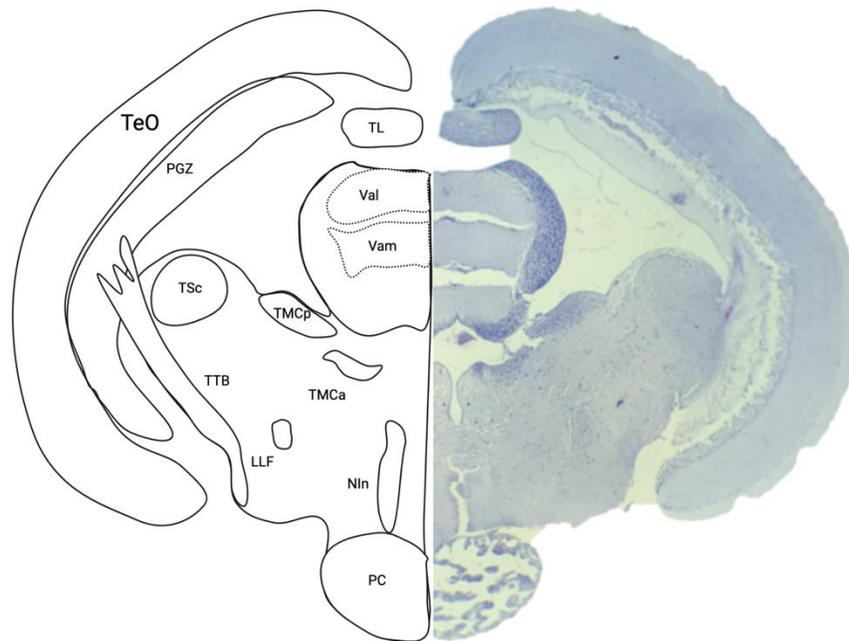
**CIL** núcleo central del lóbulo inferior

**DIL** núcleo difuso del lóbulo inferior

**Hd** hipotálamo periventricular, zona dorsal

**LR** receso lateral del ventrículo diencefálico

### Cross section XIII



**TeO** tectum óptico

**TL** torus longitudinalis

**Val** division lateral de valvula cerebelli

**Vam** division medial de valvula cerebelli

**PGZ** zona gris periventricular del tectum óptico

**TSc** núcleo central del torus semicircularis

**TMCP** tractus mesencephalocerebellaris posterior

**TMCa** tractus mesencephalocerebellaris anterior

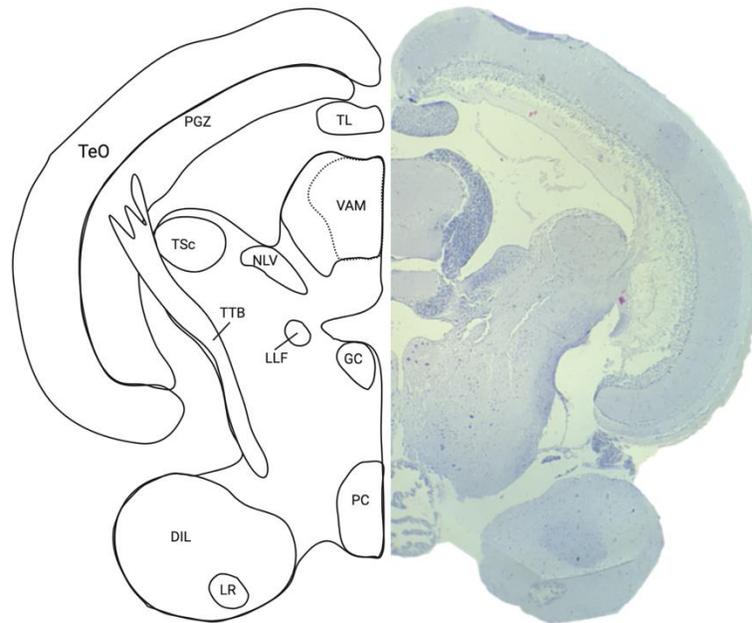
**TTB** tractus tectobulbaris

**LLF** fascículo longitudinal lateral

**Nin** núcleo interpeduncularis

**PC** plexo coroideo

### Cross section XIV



**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum óptico

**TL** torus longitudinalis

**Vam** division medial de valvula cerebelli

**TSc** núcleo central de torus semicircularis

**NLV** nucleus lateralis valvulae

**TTB** tractus tectobulbaris

**LLF** fascículo longitudinal lateral

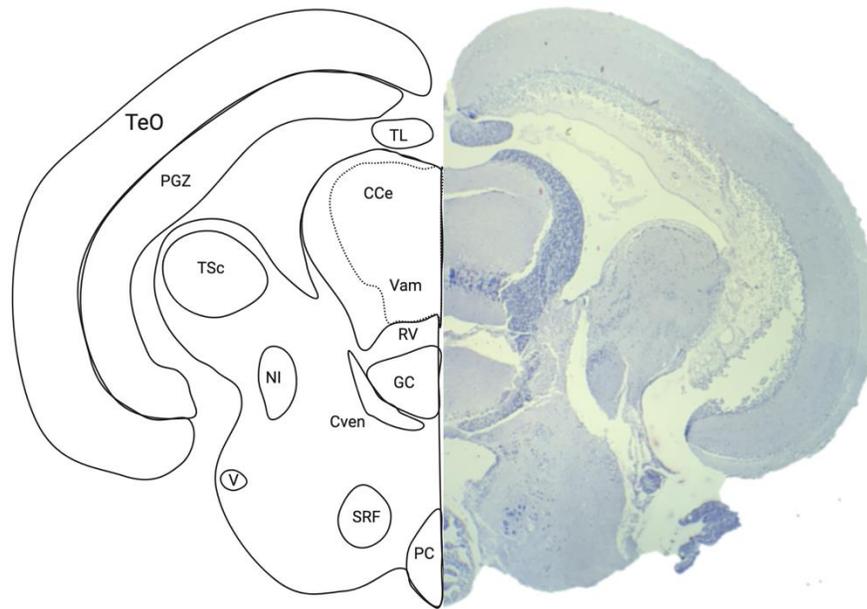
**GC** griseum centrale

**PC** plexo coroideo

**DIL** núcleo difuso del lóbulo inferior

**LR** receso lateral del ventrículo diencefálico

## Cross section XVI



**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum  
óptico

**TL** torus longitudinalis

**CCe** corpus cerebelli

**Vam** division medial de valvula cerebelli

**RV** ventrículo romboencefálico

**TSc** núcleo central de torus semicircularis

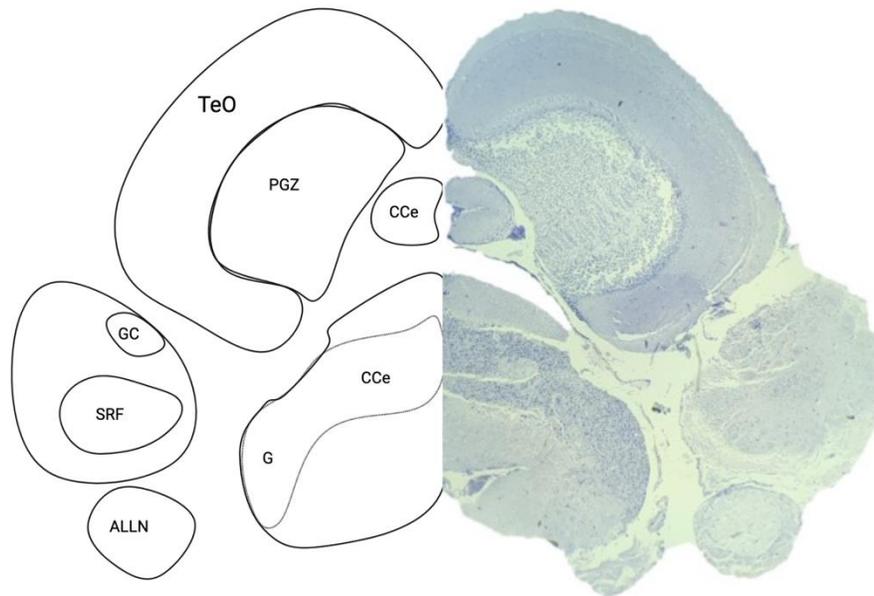
**GC** griseum centrale

**Cven** comisura ventral de romboencefalo

**NI** nucleus isthmi

**V** nervio trigeminal

**SRF** formación reticular superior

**Cross section XXI**

**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum  
óptico

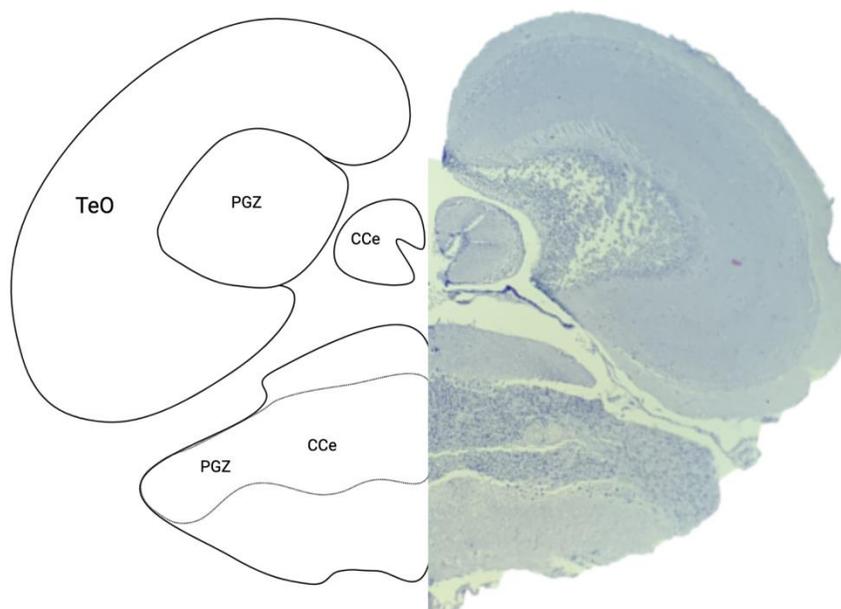
**CCe** corpus cerebelli

**G** capa granular del cerebello

**GC** griseum centrale

**SRF** formación reticular superior

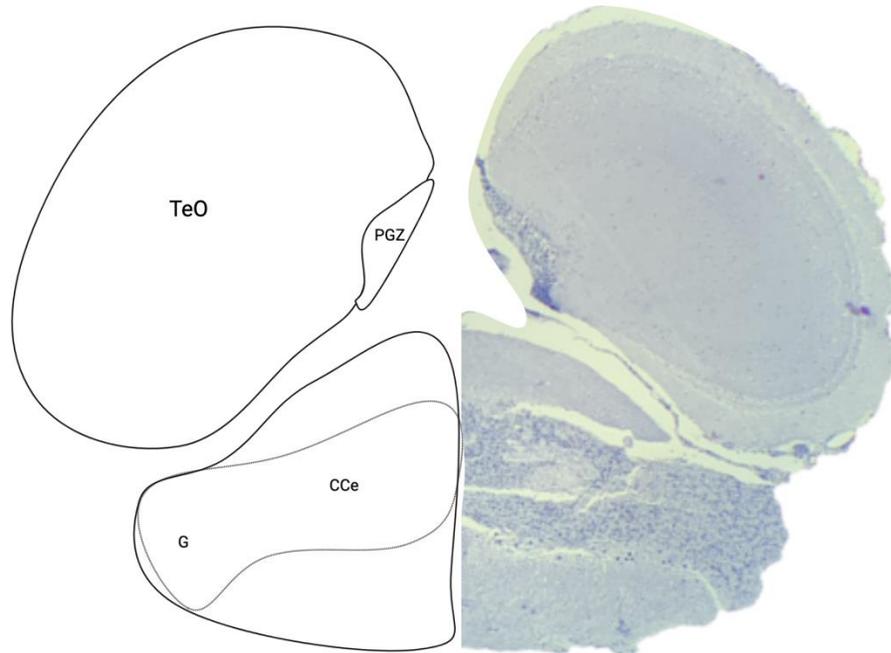
**ALLN** nervios de línea lateral anterior

**Cross section XXX-1**

**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum óptico

**CCE** corpus cerebelli

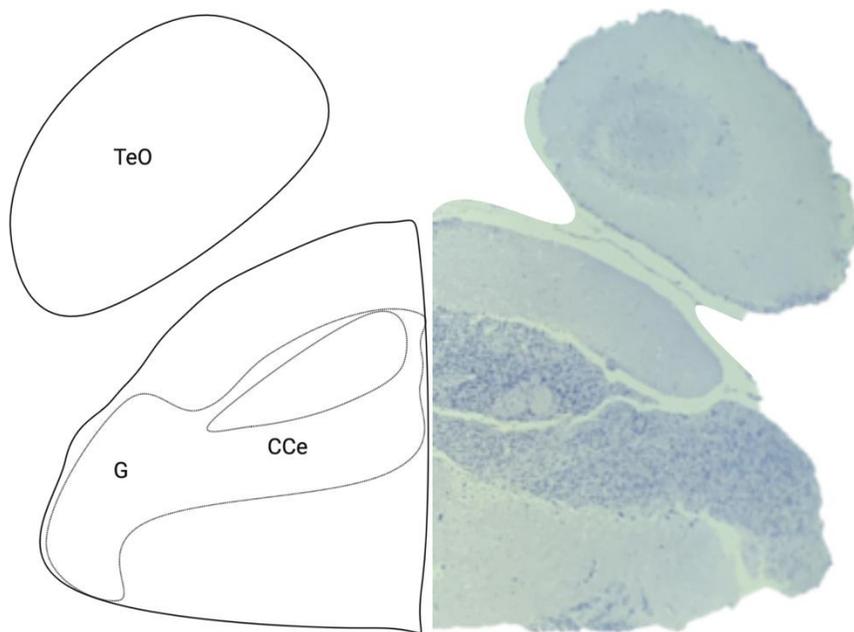
**Cross section XXX-2**

**TeO** tectum óptico

**PGZ** zona gris periventricular del tectum óptico

**CCe** corpus cerebelli

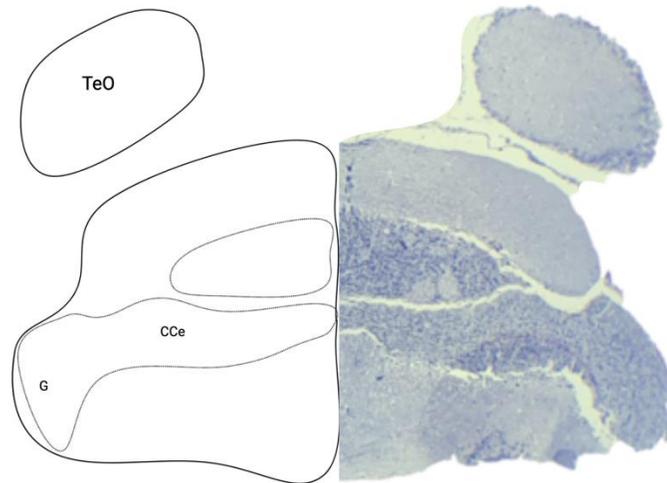
**G** capa granular del cerebello

**Cross section XXX-3**

**TeO** tectum óptico

**CCe** corpus cerebelli

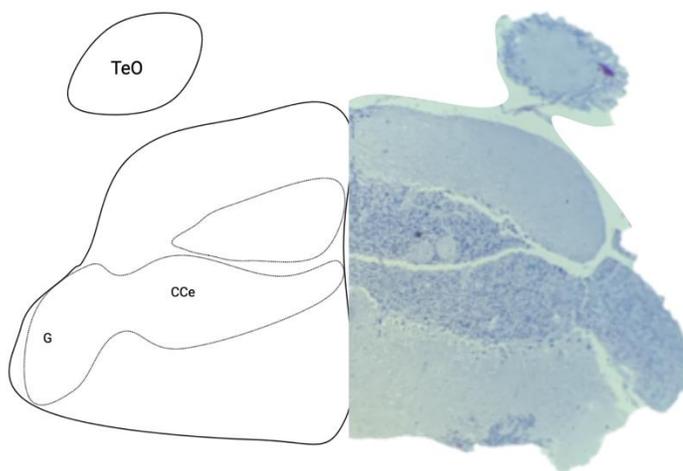
**G** capa granular del cerebello

**Cross section XXX-4**

**TeO** tectum óptico

**CCe** corpus cerebelli

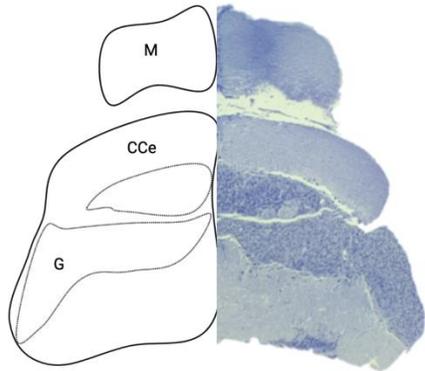
**G** capa granular del cerebello

**Cross section XXX-5**

**TeO** tectum óptico

**CCe** corpus cerebelli

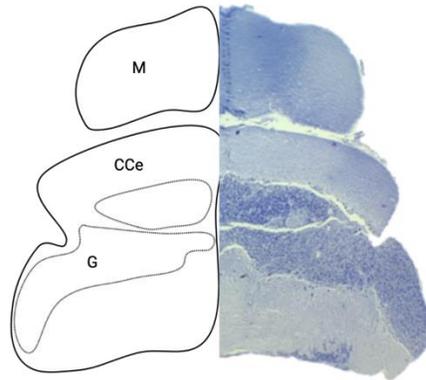
**G** capa granular del cerebello

**Cross section XXX-6**

**M** capa molecular del cerebello

**CCe** corpus cerebelli

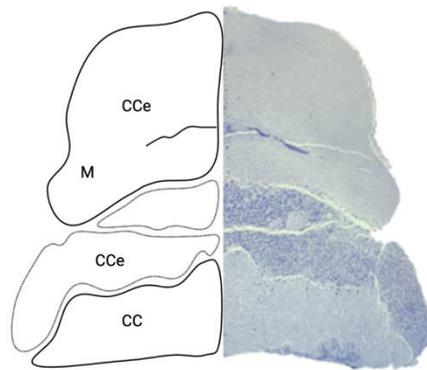
**G** capa granular del cerebello

**Cross section XXX-7**

**M** capa molecular del cerebello

**CCe** corpus cerebelli

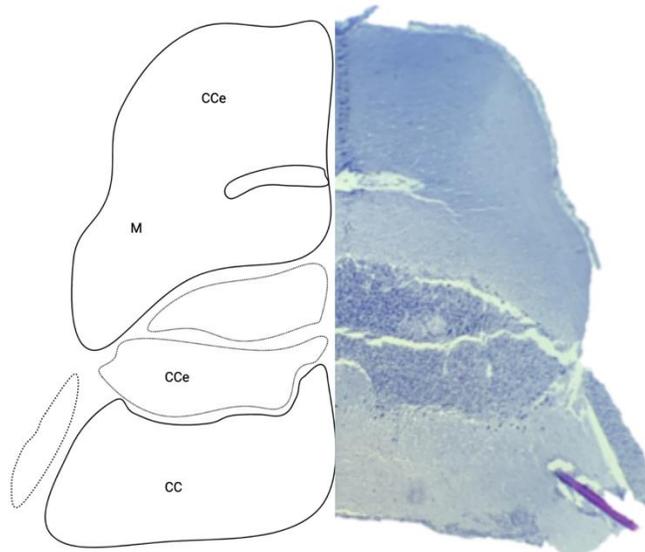
**G** capa granular del cerebello

**Cross section XXX-8**

**M** capa molecular del cerebello

**CCe** corpus cerebelli

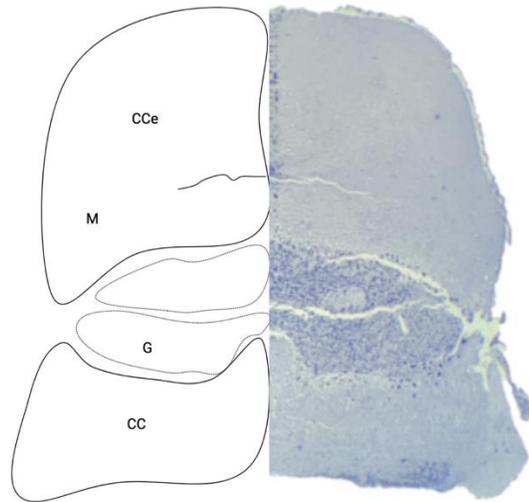
**CC** crista cerebellaris

**Cross section XXX-9**

**CCe** corpus cerebelli

**M** capa molecular del cerebello

**CC** crista cerebellaris

**Cross section XXX-10**

**CCe** corpus cerebelli

**M** capa molecular del cerebello

**G** capa granular del cerebello

**CC** crista cerebellaris

## Anexo B

### GLOSARIO

**Agudo:** síntomas o signos que comienzan y evolucionan rápidamente.

**AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, tipo de receptor ionotrópico de glutamato y canal iónico predominantemente de Na<sup>+</sup> que media la transmisión sináptica rápida en el sistema nervioso central.

**Apoptosis:** es el proceso de muerte celular programada que utilizan los organismos multicelulares para eliminar células dañadas o innecesarias.

**Barrera hematoencefálica (BHE):** estructura especializada que protege el cerebro y el sistema nervioso central de sustancias potencialmente dañinas presentes en la sangre, a la vez que permite el paso selectivo de nutrientes esenciales y moléculas necesarias para el funcionamiento cerebral.

**Cariolisis:** ruptura y disolución de la cromatina nuclear, tercera etapa de la necrosis oncótica.

**Cariorrexis:** fragmentación de la cromatina nuclear, segunda etapa de la necrosis oncótica.

**Congelamiento:** ausencia de actividad natatoria por más de diez segundos.

**Crónico:** enfermedad o afección que por lo general dura 3 meses o más y que es posible empeore con el tiempo.

**Escototaxis:** preferencia por la oscuridad. Es un modelo para peces utilizado para evaluar los efectos ansiolíticos de sustancias tóxicas.

**Excitotoxicidad:** exposición excesiva al neurotransmisor glutamato o sobreestimulación de sus receptores en la membrana de las células neuronales, lo que conduce a daño y/o muerte neuronal.

**Especies Reactivas de Oxígeno (ROS):** tipo de molécula inestable que contiene oxígeno y que reacciona fácilmente con otras moléculas de la célula. Es posible que una acumulación de especies reactivas de oxígeno en las células dañe el ADN, ARN y las proteínas, y posiblemente cause la muerte de una célula.

**Glutamato:** principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso de vertebrados.

**Hipocampo:** estructura cerebral localizada en el lóbulo temporal, por lo que forma parte del sistema límbico y cuya función está relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria.

**Kainato:** subclase de receptores tipo ionotrópico de glutamato.

**Lateralización:** especialización de cada hemisferio cerebral en la ejecución de funciones cognitivas y motoras.

**Melanismo:** exceso de pigmentación oscura en los tejidos de un organismo.

**Necrosis oncótica:** muerte celular. También conocida como necrosis u oncosis, es un proceso derivado de la activación de enzimas nucleares y es resultado de un daño irreversible a las células.

**Neurotoxina:** sustancia que es tóxica para el tejido nervioso.

**NMDA:** N-metil-D-aspartato. Tipo de receptor ionotrópico de glutamato que tiene funciones en la neuroplasticidad, un mecanismo neuronal que se considera la base de la formación de la memoria. Los receptores tipo NMDA también están implicados en el proceso de excitotoxicidad.

**Picnosis:** condensación de la cromatina nuclear, primera etapa de la necrosis oncótica.

**Receptor ionotrópico:** estructuras proteicas de la membrana plasmática neuronal que funcionan como canales iónicos específicos para determinados iones. Según sea el tipo de ión involucrado es la naturaleza del efecto que se produce cuando estos receptores se abren. Al ser canales iónicos, este tipo de receptores participan en las respuestas rápidas, excitatorias o inhibitorias que dan las neuronas.

**Tejido esponjiforme:** presencia de pequeños orificios en el tejido nervioso que dan un aspecto "esponjoso" al cerebro.

**Terminal pre-sináptica:** área especializada en el axón de la neurona que contiene vesículas sinápticas que liberan un neurotransmisor en la hendidura sináptica el cual es ligado por los correspondientes receptores post-sinápticos.

**Tigmotaxis:** tendencia de un organismo a permanecer cerca de las paredes del acuario de prueba.

**Tisular:** perteneciente o relativo a los tejidos de los organismos.

