

Estudio del impacto de un choque térmico agudo durante la gastrulación a través de una línea transgénica de pez cebra (*Danio rerio*)

Mario Barrio Robles¹, David G. Valcarce¹ y Vanesa Robles¹

¹ INDEGSAL, Área de Biología Celular, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León, Campus de Vegazana 5 s/n, 24071, León, España.
mbarro2@estudiantes.unileon.es, dgarv@unileon.es, v.robles@unileon.es

Resumen

En este estudio se ha evaluado el impacto de un choque térmico agudo sobre el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*). El estresor (1 h; 38 °C) fue aplicado al inicio de la gastrulación en la especie (6 horas post fecundación (hpf)). Embriones de la línea transgénica *Tg(hsp70l:dn-fgfr1a-EGFP)*, con inhibición inducible de la vía del factor de crecimiento de fibroblastos (Fgf), fueron utilizados para evaluar los efectos del estresor. El marco temporal de monitorización englobó la embriogénesis en la especie (hasta las 72 hpf). Se evaluaron los siguientes parámetros: supervivencia (0 hpf, 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf), eclosión (48 hpf y 72 hpf), malformaciones (72 hpf) y comportamiento (24 hpf). Nuestros resultados indican que el choque térmico no resulta letal en el marco de evaluación seleccionado, pero provoca una reducción de la tasa de eclosión y un elevado número de malformaciones en la línea *Tg(hsp70l:dn-fgfr1a-EGFP)*. Además, nuestros datos muestran alteraciones en el comportamiento a 24 hpf. Estos hallazgos evidencian que estresores agudos de muy corta duración pueden provocar serias alteraciones fisiológicas en etapas del desarrollo temprano, cuando el embrión muestra una mayor vulnerabilidad.

Palabras clave

Desarrollo embrionario, estrés, *Fgfr1a*, *hsp70*.

Introducción

Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario temprano en peces es un proceso muy sensible a condiciones ambientales, especialmente durante fases críticas tales como la gastrulación. Este es un momento crucial del desarrollo embrionario en el que se establecen los ejes corporales y se originan las capas germinales que darán lugar a todos los tejidos y órganos del animal (Solnica-Krezel, 2006). De hecho, la gastrulación se puede considerar como el primer proceso morfogénético a gran escala durante el desarrollo, coincidiendo, con la segregación de las capas

embrionarias: ectodermo y endodermo en animales diblásticos y el mesodermo en animales triblásticos (Rohde y Heisenberg, 2007; Muhr *et al.*, 2023). En el segundo grupo se incluyen los peces, vertebrados foco de estudio del presente trabajo. Durante esta etapa del desarrollo embrionario temprano destacan como eventos característicos los movimientos de las células embrionarias que alteran, en último término, la forma del organismo en desarrollo (Solnica-Krezel, 2006). Esta distribución de las células precursoras es necesaria, y clave, junto con otros procesos de intercalación, diferenciación y proliferación celular (Bruce y Heisenberg, 2020) para la correcta formación de las citadas capas embrionarias. Debido a la complejidad a nivel molecular que implican estos cambios morfofuncionales durante la embriogénesis, los ejemplares exhiben gran vulnerabilidad frente a factores externos o estresores (Nunes *et al.*, 2020) que pueden alterar la correcta orquestación en los programas de expresión génica que regulan el proceso. En consecuencia, la gastrulación constituye un punto crítico para evaluar los efectos del estrés ambiental.

Estrés

El estrés, al que podemos definir como un estímulo que afecta al mantenimiento de la propia homeostasis (Chrousos, 2009; Herman, 2013), puede ser categorizado como agudo o crónico (Demin *et al.*, 2021) en función de la duración y del tipo de respuestas moleculares y fisiológicas que se generan en el organismo (Schreck y Tort, 2016). Por otro lado, y en función de su origen, puede categorizarse como externo o interno, destacándose dentro del primer tipo, el ambiental (Kagias *et al.*, 2012). Los seres vivos están adaptados a vivir en rangos determinados para cada parámetro abiótico, sin embargo, alteraciones de las condiciones fuera del margen de tolerancia de la especie, producen la aparición de estrés ambiental (Kagias *et al.*, 2012). Uno de los tipos de estrés ambiental más ampliamente estudiado es el estrés térmico. Éste se puede definir como la respuesta de un organismo a una exposición aguda o crónica a una temperatura fuera de sus rangos óptimos, ya sea por encima (hipertermia) o por debajo (hipotermia). Numerosos estudios han evidenciado que desviaciones significativas de la temperatura óptima, incluso si son transitorias, pueden generar serias alteraciones en el organismo (Blatteis, 2007; Haapanen-Saaristo, 2024; Miller *et al.*, 2025). Los determinados “choques térmicos agudos” o “*heat shocks*” (incrementos o descensos repentinos de temperatura durante un corto periodo de tiempo) pueden desencadenar respuestas celulares de estrés, alterando el ciclo celular e incluso induciendo apoptosis, dependiendo del momento del desarrollo en el que ocurran (Nakai e Ishikawa, 2001).

El uso de estrés térmico puntual en experimentos controlados permite evaluar el impacto de perturbaciones breves pero intensas, que resultan especialmente relevantes en estudios sobre los efectos del estrés. Además, resultan de interés para la comunidad científica para comprender mejor cómo eventos tales como olas de calor, cambios térmicos abruptos en aguas superficiales o fallos en

sistemas de regulación térmica en instalaciones de acuicultura, que pueden exponer a los embriones de distintas especies acuáticas a picos de temperatura de corta duración, cuyas consecuencias pueden ser impredecibles y potencialmente negativas.

Pez cebra como modelo

Para poder realizar un estudio preciso sobre como el estrés térmico agudo durante el inicio de la gastrulación puede afectar al desarrollo, hemos utilizado como especie modelo el pez cebra (*Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822)). Este cipriniforme habita los ríos, lagos y estanques del sudeste asiático (Istiaque y Khan, 2018). Es un organismo modelo de vertebrados muy utilizado en biología del desarrollo debido a diversas propiedades (Bedell *et al.*, 2025), entre las que se encuentra un fácil manejo en laboratorio y mantenimiento, su pequeño tamaño, su fecundación externa y su elevada prolificidad—una hembra puede poner cientos de huevos en condiciones de estabulación óptimas (Hisaoaka y Firlit, 1962)—. Otra característica importante es el gran tamaño (1 mm aproximadamente) y la transparencia de sus huevos, embriones y larvas en los primeros días tras la fecundación, permitiendo la visualización del desarrollo embrionario (Kimmel *et al.*, 1995) y la monitorización de moléculas trazables *in vivo* (Ignatiusy Langenau, 2011). Estas características lo convierten en un organismo excepcional para el estudio de los efectos del estrés, especialmente aquellos involucrando alteraciones ambientales. En base al foco de interés del presente estudio, cabe destacar que el pez cebra adulto puede sobrevivir en un espectro amplio de temperaturas: desde 16,5 °C hasta 38,6 °C, teniendo su óptimo entre 27 y 28,5 °C (Feugere *et al.*, 2021).

Tg(hsp70l:dn-fgfr1a-EGFP)

En este estudio, se seleccionó una exposición breve e intensa (1 h a 38°C) aplicada a las 6 horas post fecundación (hpf), momento correspondiente al inicio de la gastrulación en la especie (Kimmel *et al.*, 1995), con el objetivo de analizar si este tipo de estresor agudo puede alterar el desarrollo embrionario, afectando a supervivencia, eclosión, tasas de malformaciones y comportamiento. Para realizar este análisis se usó una línea transgénica: “hsp70” Tg(hsp70l:dn-fgfr1a-EGFP). Dicha línea presenta un gen de fusión *fgfr1-egfp* dominante negativo bajo el promotor de *heat shock protein 70* (*hsp70*). La proteína Hsp70 es una chaperona (una proteína que favorece el plegamiento de otras proteínas) que se ve sobreexpresada en condiciones de estrés celular. Bajo estas situaciones estresantes, la sobreexpresión celular de Hsp70 va acompañada, por lo tanto, de: 1) la expresión de un Fgfr1a (receptor 1a del factor de crecimiento de fibroblastos) aberrante que inhibe la función normal del receptor, por un lado y, 2) una expresión de GFP (*green fluorescent protein*), por otro. Así, la vía de señalización de Fgf (factor de crecimiento de fibroblastos) que se activaría gracias a la existencia de un receptor sin alterar, se ve inhibida en este transgénico al exponer al organismo a estrés celular, ya que es el promotor de *hsp70* quien controla la expresión génica del

receptor aberrante Fgfr1a. Esta vía de señalización es de suma importancia en la gastrulación ya que está involucrada en diversos procesos cruciales en el desarrollo, tales como el patrón de distribución de los ejes embrionarios (Dorey y Amaya, 2010) o para la formación del mesodermo (Ciruna y Rossant, 2001).

Objetivos

Evaluar el efecto de un choque térmico agudo aplicado durante el comienzo de la gastrulación en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*), mediante el análisis de parámetros de viabilidad embrionaria, eclosión, malformaciones y comportamiento en la línea transgénica *Tg(hsp70l:dn-fgfr1a-EGFP)*.

Material y Métodos

Consideraciones éticas

El marco temporal en el que se desarrollaron los experimentos del presente trabajo nunca superó los tres días de vida de los peces. La legislación actual vigente en la UE (Directiva Europea 2010/63/EU) no protege a los ejemplares de pez cebra hasta superar los 5 días de vida, una vez completada la organogénesis de la especie, cuando las larvas son autónomas para su alimentación (Ng *et al.*, 2005). No se necesitaron permisos del Comité de Bioética de la Universidad de León (ULE) para la realización de este proyecto.

Modelos animales

El experimento se realizó con embriones de pez cebra (*D. rerio*) procedentes la línea transgénica (*Tg(hsp70l:dn-fgfr1a-EGFP)*) (**Fig. 1A**) que forma parte de la colonia de peces cebra del grupo REPRODOL en el Servicio de Investigación y Bienestar Animal de la ULe. Estos embriones fueron adquiridos y transportados desde el *European Zebrafish Resource Center* (EZRC) en Alemania. Los ejemplares fueron criados en las instalaciones del grupo hasta tener colonias de adultos reproductores. Los peces adultos utilizados como reproductores fueron mantenidos en condiciones estándar (Westerfield, 2000). Los ejemplares se mantuvieron alimentados dos veces al día con pienso comercial Zebrafeed (Sparos, Portugal), permaneciendo en sus tanques de estabulación bajo un fotoperiodo de 14 horas de luz - 10 horas de oscuridad y a una temperatura controlada de 27 ± 1 °C. Para la obtención de los embriones, la tarde previa al inicio de la réplica experimental, se prepararon los tanques de reproducción externos al sistema de estabulación, introduciendo 2 hembras y 1 macho separados por una barrera física (**Fig. 1B**). Pasada la noche, tras aproximadamente 30 min del encendido de las luces en la sala, se retiraron barreras físicas promoviendo el cortejo entre los peces. Tras 1-2 h, se devolvieron los peces a sus tanques y se recogieron los huevos fertilizados con la ayuda de un colador. Tras un lavado con agua, los embriones se pasaron con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico a placas Petri de 55 mm

de diámetro con medio para embriones (ME: 0,137 M NaCl; 5,4 mM KCl; 0,25 mM Na₂HPO₄; 0,44 mM KH₂PO₄; 1,3 mM CaCl₂; 1,0 mM MgSO₄; 4,2 mM NaHCO₃; azul de metileno 0,1 % (p/v); pH = 7,00). Los embriones se mantuvieron en estas placas stock hasta la división en grupos experimentales.

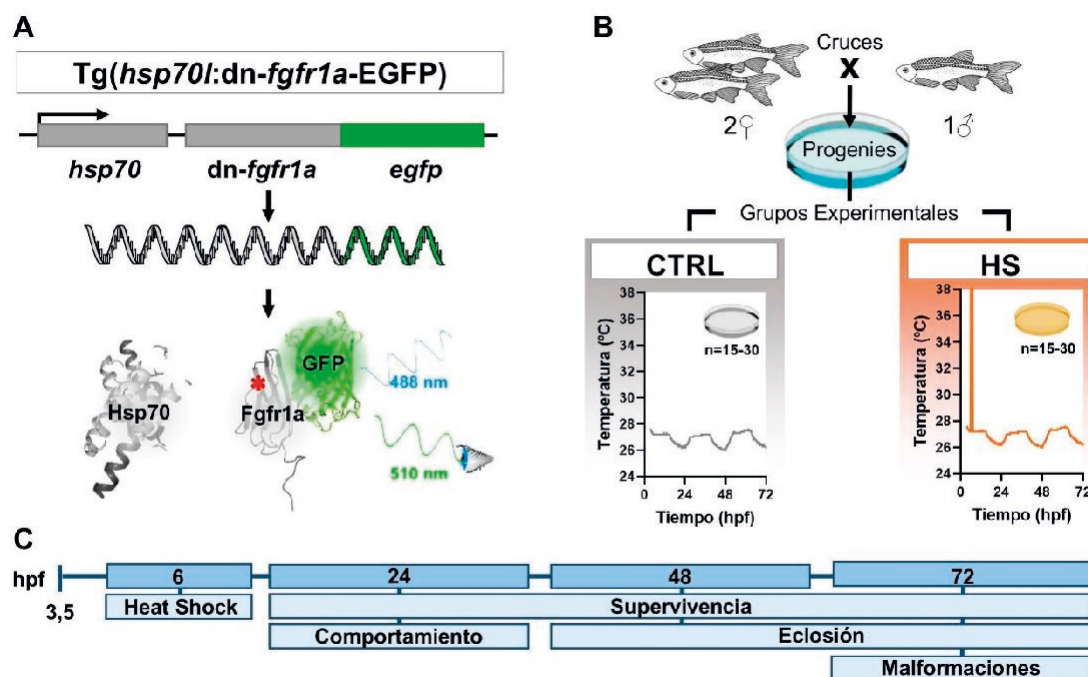


Figura 1. Representación gráfica del diseño experimental. **A)** Diagrama de la construcción génica presente en *Tg(hsp70l:dn-fgfr1a-EGFP)* (el asterisco rojo representa una forma aberrante de Fgfr1a). **B)** Representación secuencial del trabajo experimental y generación de grupos experimentales (entre 15 y 30 embriones por réplica biológica). **C)** Marco temporal del experimento y parámetros estudiados en cada punto temporal. hpf: horas post fecundación. HS: *heat shock*.

Diseño experimental

A partir de las placas stock, de cada réplica experimental se obtuvieron dos placas (**Fig. 1B**). Ambas fueron preparadas con el mismo número de huevos en cada una ($n = 15 - 30$). Cada pareja de placas respondía a una réplica biológica, donde una de ellas actuaba como placa control (CTRL) y la otra actuaba como placa sometida a choque térmico (*heat shock*; HS). Las placas del grupo CTRL fueron sometidas durante todo el experimento a temperatura estándar (27 ± 1 °C) mientras que las del grupo HS fueron expuestas a las 6 hpf (etapas iniciales de la gastrulación (Kimmel *et al.*, 1995)) a 38 °C durante 1 hora. El resto del tiempo, las placas HS se mantuvieron junto a las placas control a la temperatura estándar en la sala del animalario (**Fig. 1B**). Los parámetros analizados en cada punto temporal del experimento están recogidos en la **Figura 1C**. El marco temporal del experimento incluyó desde este momento de generación de las placas experimentales (3,5 hpf) hasta las 72 hpf, fin de la embriogénesis (Kimmel *et al.*,

1995). En total se realizaron 13 réplicas biológicas. Los ejemplares incluidos en las placas experimentales fueron seleccionados siguiendo un criterio basado en la observación mediante un microscopio estereoscópico (Kyowa Optical SD - 2PL). Sólo aquellos embriones presentando un patrón de desarrollo canónico (Kimmel *et al.*, 1995) fueron escogidos para las placas (**Fig. 2A**).

Supervivencia

La supervivencia se cuantificó a lo largo de tres instantes distribuidos en el marco temporal: 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf. Para realizar esta tarea se revisaban las placas que contenían a los embriones a través del microscopio estereoscópico, analizando la supervivencia mediante una comprobación del latido del corazón de los individuos. Al encontrar embriones muertos se retiraban de la placa con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico.

Eclosión

A las 48 hpf, con la ayuda del microscopio estereoscópico, se cuantificaron los ejemplares que hubieran salido del corion—la envoltura acelular que protege al embrión—, de forma prematura. Asimismo, este procedimiento se repitió a las 72 hpf con el fin de localizar, en caso de haberlos, los embriones sin eclosionar, valorando así la tasa de eclosión en las placas a 48 y 72 hpf.

Malformaciones

El análisis de individuos malformados se realizó a las 72 hpf comparando la morfología de todas las larvas presentes en las placas con el estadio de boca protuberante descrito por Kimmel (Kimmel *et al.*, 1995) para este punto temporal.

Estudio de comportamiento

A 24 hpf, se cuantificó el número de movimientos por minuto que realizaban los embriones en el corion a través de grabaciones de vídeo capturados con la ayuda de la lupa Nikon SMZ25 (cámara DS-Ri2) y el software NISElements AR v.6 (Nikon). El procedimiento consistió en una grabación de un minuto por placa en la que todos los embriones de la réplica estuvieran en campo. En una etapa posterior, los vídeos fueron editados para multiplicar la velocidad cuatro veces empleando la aplicación de uso libre CapCut y se contabilizaron el número de movimientos que realizaba cada embrión de cada placa.

Análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico y el graficado de los datos se utilizó el software GraphPad v8.0.1. La curva de supervivencia fue analizada con una prueba de Mantel-Cox. La normalidad de todas las variables fue testada con un test de Shapiro-Wilk. La comparación de variables normales se realizó usando un test *t*

de Student, con corrección de Welch en el caso de trabajar con variables con desviaciones estándar no iguales. La comparación entre variables no paramétricas se llevó a cabo mediante una prueba de Mann-Whitney. Se describe la n correspondiente al número de réplicas biológicas en cada pie de figura. En las gráficas las barras de error representan medias \pm error estándar de la media (SEM). Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Supervivencia

El análisis de supervivencia diaria (**Fig. 2B**) generó curvas de Kaplan-Meier que se mantuvieron por encima del 75 % de supervivencia tanto en las réplicas CTRL y las HS a las 72 hpf (**Fig. 2C**). No se reportaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las curvas de supervivencia ($p = 0,0722$; **Fig. 2C**).

Eclosión

Al analizar estadísticamente los valores de porcentaje de eclosión (**Fig. 2D**) a 48 hpf no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,1716$), mientras que a las 72 hpf la línea si registró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0011$; **Fig. 2D**) siendo el valor medio la tasa de eclosión del grupo experimental HS de $67,85 \pm 9.162$ % mientras que en el grupo CTRL se mantuvo cercano al 100 %.

Malformaciones

El análisis estadístico de la tasa de malformaciones al final de la embriogénesis reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p = 0,0053$) (**Fig. 2E**). El grupo HS mostró una tasa media de malformaciones en las placas por encima del 35 % mientras que el grupo CTRL entorno al 5 %. A su vez, se identificó que el tipo de malformaciones mayoritario (**Fig. 2F**) en el grupo control fueron malformaciones únicas (edema cardiaco, malformación esquelética) mientras que en el grupo HS las malformaciones múltiples (combinaciones de varios tipos de malformaciones en un mismo ejemplar) supusieron un 93,3 % del total de fenotipos encontrados en las larvas.

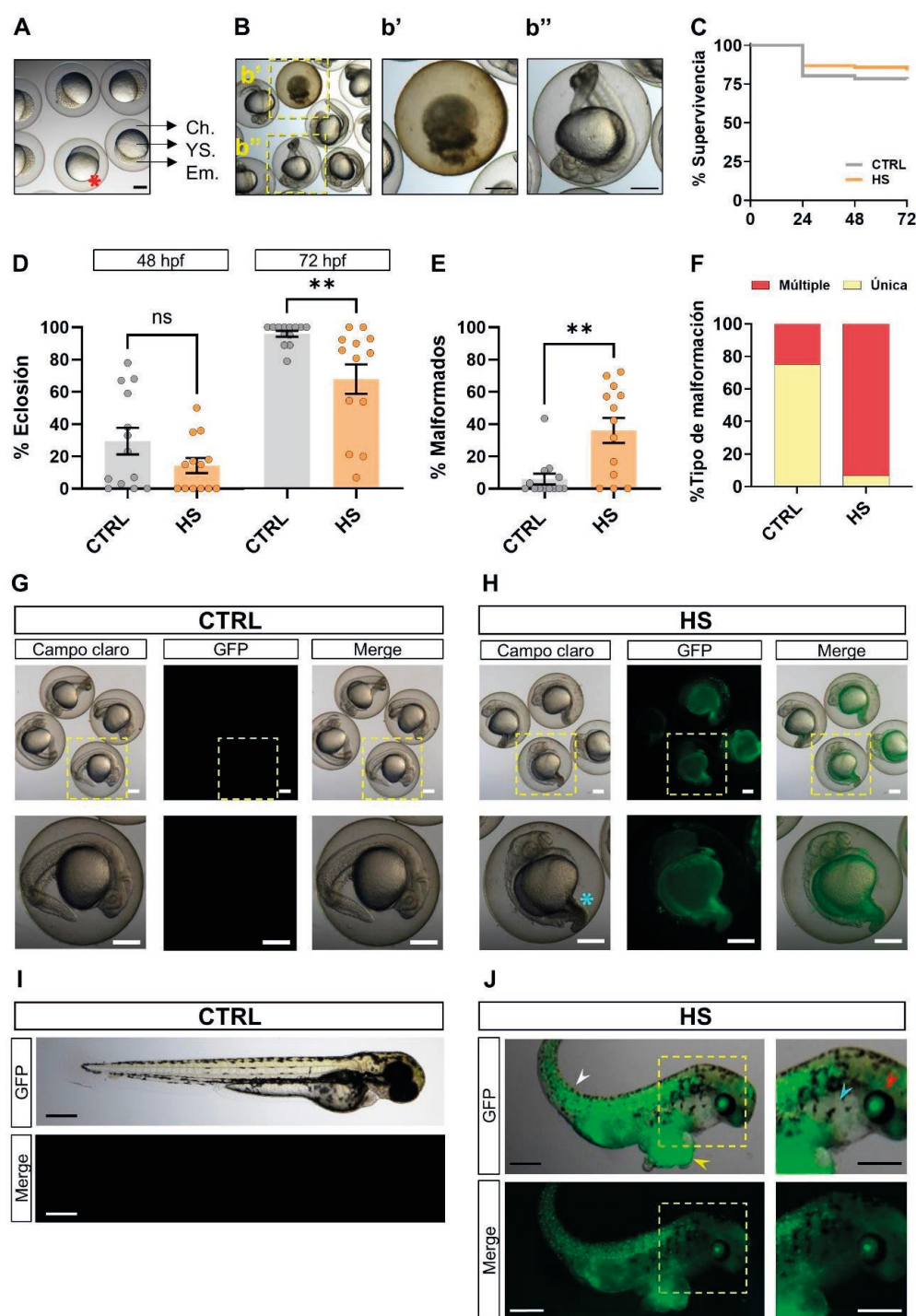


Figura 2. Impacto del choque térmico (HS) durante la gastrulación en *D. rerio*. **A)** Embriones a 3–3.5 hpf; asterisco rojo: ovocito no fecundado. Ch: corion; YS: saco vitelino; Em: embrión. **B)** Embriones a 24 hpf: **b'**) abortado; **b''**) viable. **C)** Supervivencia. **D)** Eclosión a 48/72 hpf. **E)** Malformaciones a 72 hpf. **F)** Tipología de malformaciones. **G–H)** Fenotipos a 24 hpf; en H, asterisco celeste: cola aberrante. **I–J)** Fenotipos a 72 hpf; flechas: blanca, defecto esquelético; amarilla, reabsorción vitelina incompleta; celeste, edema; roja, microftalmia. Escala: 250 μ m. $p < 0,0100$; $ns > 0,0500$. $n = 13$.

El impacto del choque térmico durante la gastrulación fue evidenciado a las 24 hpf. Mientras que los embriones del grupo CTRL presentaron un fenotipo canónico a las 24 hpf (**Fig. 2G**), los embriones del grupo HS mostraron a lo largo de todo su cuerpo una elevada expresión de GFP derivada del control de su expresión bajo el promotor de *heat shock protein 70* (**Fig. 2H**). Esta fluorescencia fue concomitante con la aparición de colas aberrantes y desarrollo corporal afectado al expresarse la forma incorrecta de Fgfr1a.

A las 72 hpf, a diferencia de las réplicas del grupo CTRL (**Fig. 2I**), las larvas del grupo HS (**Fig. 2J**), presentaban fenotipos severos en muchos de los casos acumulando malformaciones múltiples que correlacionaban con una elevada expresión de la proteína verde fluorescente en todo el cuerpo de la larva y una reducción notable en el tamaño de las larvas.

Comportamiento

El análisis estadístico realizado reveló que el *tail coiling* (número de movimientos que los embriones realizan en el interior del corion; **Fig. 3A**) por minuto y réplica a las 24 hpf, se vio reducido en el grupo HS ($p = 0,0050$; con una media en el grupo CTRL de $3,911 \pm 0,4567$ frente a la media de $2,214 \pm 0,3037$ en el grupo HS; **Fig. 3B**). El histograma presentado en la **Figura 3C** muestran una diferente distribución de los perfiles obtenidos en cada población total de individuos estudiados, con una población elevada de ejemplares sin movimientos en el interior del corion.

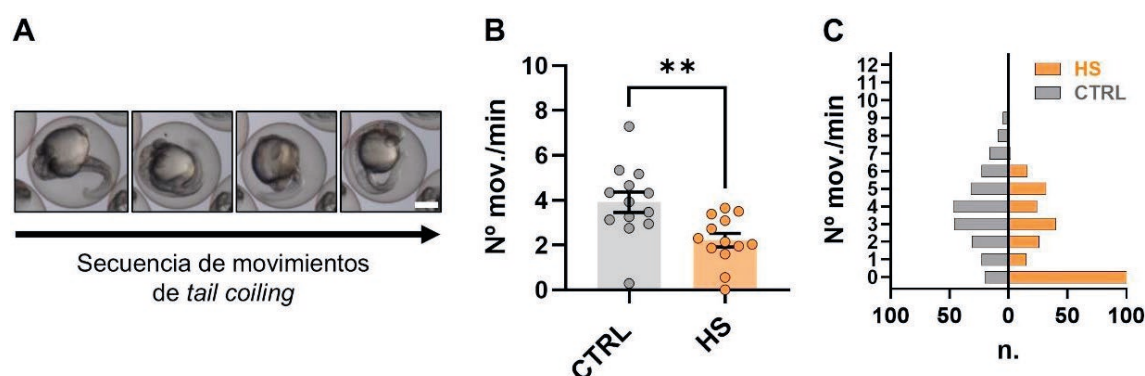


Figura 3. Impacto del choque térmico durante la gastrulación en el comportamiento del pez cebra a 24 hpf. **A)** Secuencia de movimientos realizada por un embrión, representativa del *tail coiling*. **B)** Número medio de movimientos por minuto y réplica de los embriones (test de *t* de Student). **C)** Histograma de movimientos individuales. Escala: 250 μ m. ** $p < 0,0100$. $n = 13$.

Discusión

El pez cebra (*D. rerio*) se considera un excelente modelo animal para el estudio del estrés durante las primeras etapas de desarrollo. Esto es debido a las características de sus embriones (Bedell *et al.*, 2025), a su desarrollo embrionario acelerado (Kimmel *et al.*, 1995) y a su sistema de respuesta al estrés (Eachus

et al., 2021). En este trabajo hemos expuesto a los embriones de pez cebra a una temperatura supra-óptima con el fin de estudiar cómo afecta este estresor durante etapas clave del desarrollo temprano, desde un punto de vista fisiológico y morfológico.

La curva de supervivencia es uno de los indicadores más evidentes del desarrollo general de las progenies en peces ante estresores (Curcio *et al.*, 2021; Valcarce *et al.*, 2024) y en condiciones de laboratorio estándar varía entre 70 y 90 % (Lawrence *et al.*, 2010). El estrés térmico inducido en nuestro estudio no reveló diferencias entre las curvas de supervivencia de los embriones en grupos CTRL y HS (**Fig. 2C**) indicando que, el choque térmico analizado no tiene efectos sobre la tasa de supervivencia en el marco temporal estudiado. En experimentos previos con mayores periodos de exposición al estresor, se han registrado descensos significativos en la supervivencia tanto en condiciones de hipotermia o hipertermia. De Souza *et al.* (2025) realizando una exposición a temperaturas sub-óptimas (22 °C durante 120 hpf) y Schnurr *et al.* (2014) exponiendo a los embriones a hipertermia durante todo el proceso de embriogénesis (34 °C, 36 °C y 38 °C desde 0 hpf a 72 hpf) obtuvieron descensos significativos en supervivencia, pero en ambos casos, el periodo de exposición al estresor era muy superior al de este estudio. Es precisamente la ausencia de diferencias en la supervivencia lo que confiere un valor añadido a este estudio, al permitir analizar los efectos fisiológicos y moleculares de estresores sutiles cuya influencia no se manifiesta en parámetros tan evidentes como la mortalidad. La eclosión de las larvas es una etapa crítica en el ciclo de vida de los metazoos y se corresponde a la liberación de los individuos del corion, lo que supone el final de la embriogénesis y el inicio de la etapa larvaria (Gilbert, 2000). La eclosión en los peces ocurre cuando la morfogénesis de muchos de los órganos rudimentarios ya está prácticamente completada, con algunas excepciones que terminan su desarrollo a las 120 hpf (Kimmel *et al.*, 1995). Las alteraciones de la eclosión (retraso, inhibición o aceleración) en los peces pueden ser causadas por diversos factores endógenos y exógenos, incluyendo los contaminantes ambientales (De La Paz *et al.*, 2017). El impacto de nuestro estresor térmico agudo provocó una reducción en la capacidad de eclosión a las 72 hpf (**Fig. 2D**). En condiciones de laboratorio estándar, la eclosión se produce entre las 48 hpf (los individuos más tempranos) y a las 72 hpf (las larvas más tardías) (Kimmel *et al.*, 1995). La reducción en la tasa de eclosión en esta especie es utilizada habitualmente como un indicador del impacto provocado de factores externos tales como presencia de tóxicos en el medio (Li *et al.*, 2018) o internos tales como mutaciones en genes clave (Elabd *et al.*, 2019). Nuestros datos, mostrando esta reducción de la tasa de eclosión a 72 hpf en la línea *hsp70* (**Fig. 2D**), pueden estar vinculados con la elevada tasa de malformaciones múltiples registrada en este grupo experimental (**Fig. 2F**), provocando que las larvas se vean incapacitadas para liberarse del corion. Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Pype *et al.* (Pype *et al.*, 2015), quienes observaron una reducción en la tasa de eclosión al mantener los embriones con hipertermia (36,5 °C) durante

las primeras 96 hpf, se refuerza la idea de que la eclosión es un proceso con una dependencia multifactorial, en el que influye tanto la duración y naturaleza del estresor, como el tipo de la respuesta génica asociada.

Por otro lado, en nuestro estudio, la exposición al estresor incrementó significativamente el porcentaje de embriones malformados superando el 35 % de las larvas analizadas (**Fig. 2E**). La línea transgénica *Tg(hsp70l:dn-fgfr1a-EGFP)* incorpora una construcción génica que explica la aparición de fenotipos severamente malformados en los embriones expuestos al choque térmico (**Fig. 2F, 2H y 2J**). La señalización celular mediada por Fgf participa en la proliferación, migración y especificación de numerosos tipos celulares (Thisse y Thisse, 2005), siendo crucial en desarrollo y estando altamente conservada en diferentes especies (Itoh, 2007). En consecuencia, la sobre-expresión de Hsp70 media la expresión del mutante negativo Fgfr1a en condiciones de estrés desencadenando una desregulación inhibitoria de las vías mediadas por este receptor. El uso de esta línea resulta especialmente valioso, ya que permite inducir de forma controlada una inhibición específica de la señalización Fgf mediante un estímulo ambiental (el calor). Esto la convierte en una herramienta experimental potente para estudiar los mecanismos moleculares y celulares implicados en la respuesta al estrés térmico, así como para evaluar cómo la alteración de vías conservadas del desarrollo puede amplificar los efectos de estresores ambientales. En nuestro estudio pudimos observar que a 72 hpf, ningún individuo del grupo control presentó malformaciones múltiples, mientras que la mayoría de los ejemplares malformados del grupo sometido a choque térmico las mostraron (**Fig. 2F**).

El comportamiento constituye un indicador del estado fisiológico y neurológico de los organismos, reflejando de manera temprana los efectos de la exposición a estresores (de Abreu *et al.*, 2021). El comportamiento de los embriones de pez cebra se puede medir a través del número de movimientos que realizan con la cola por minuto, también llamado *tail coiling*. Se trata de contracciones musculares del tronco que suponen sus primeras respuestas motoras (**Fig. 3A**), iniciando a las 17 hpf, alcanzando su máximo a las 19 hpf y decayendo a partir de las 26 hpf (de Olivera *et al.*, 2021). Por norma general, una reducción del número de movimientos por minuto en el embrión, suele estar vinculado a problemas en el desarrollo (Zindler *et al.*, 2019). Basándonos en lo discutido previamente en relación a la tasa de malformaciones presente en los ejemplares de la línea “*hsp70*”, los resultados de la evaluación del *tail coiling* es la esperada (**Fig. 3B y 3C**). En esta línea transgénica, el grupo experimental HS sometido a choque térmico muestra una reducción muy drástica de los valores del número de movimientos por minuto comparado con el grupo CTRL, no perturbado durante el experimento. La expresión del alelo dominante negativo de Fgfr1a frente al choque térmico induce una deficiencia severa en la locomoción tal como refleja el valor medio del *coiling*. La hipoactividad registrada en las larvas de las placas HS se asemeja a la registrada en ensayos con exposición a ciertos neurotóxicos (Zindler *et al.*, 2019), lo que sugiere que un choque térmico agudo durante la gastrulación puede ejer-

cer un efecto comparable a un agente neurotóxico sobre el comportamiento. Este hallazgo refuerza la relevancia del modelo empleado, ya que pone de manifiesto su sensibilidad para detectar alteraciones funcionales sutiles derivadas de estresores tempranos, consolidándolo como una herramienta útil para explorar los vínculos entre estrés ambiental, desarrollo neurológico y desempeño conductual.

Conclusiones

En resumen, nuestros hallazgos subrayan el impacto significativo de un estresor agudo durante el inicio de la etapa de gastrulación en el pez cebra como organismo modelo. El choque térmico agudo empleado no afectó a las curvas de supervivencia durante la embriogénesis en la línea transgénica utilizada, pero provocó una reducción de la tasa de eclosión y un elevado número de malformaciones en las larvas. El análisis de *tail coiling* a 24 hpf reveló que el pico de estrés en el inicio de la gastrulación afectó de manera temprana el comportamiento de los embriones. Estos resultados ponen de manifiesto que los estresores abióticos pueden inducir alteraciones fisiológicas diversas, incluyendo las conductuales, en vertebrados en desarrollo incluso cuando la exposición es breve, subrayando la sensibilidad de etapas críticas del desarrollo frente a perturbaciones ambientales.

Bibliografía

- Bedell, V. M., Dubey, P., Lee, H. B., Bailey, D. S., Anderson, J. L., Jamieson-Lucy, A., Xiao, R., Leonard, E. V., Falk, M. J., Pack, M. A., Mullyns, M., Farber, S. A., Eckenoff, R. G. y Ekker, S. C. 2025. Zebrafishology, study design guidelines for rigorous and reproducible data using zebrafish. *Communications Biology*. 8:1-14. doi:10.1038/s42003-025-07496-z.
- Blatteis, C. M. 2007. Thermal Stress. *Encyclopedia of Stress*. Academic Press, pp. 723-726. doi:10.1016/B978-012373947-6.00375-5.
- Bruce, A. E. E. y Heisenberg, C. P. 2020. Mechanisms of zebrafish epiboly: A current view. *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press Inc., 136, pp. 319-341. doi:10.1016/bs.ctdb.2019.07.001.
- Chrousos, G. P. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group, 5(7), pp. 374-381. doi:doi.org/10.1038/nrendo.2009.106.
- Ciruna, B. y Rossant, J. 2001. FGF Signaling Regulates Mesoderm Cell Fate Specification and Morphogenetic Movement at the Primitive Streak. *Developmental Cell*. 1(1), pp. 37-49. doi:10.1016/S1534-5807(01)00017-X.
- Curcio, V., Macirella, R., Sesti, S., Pellegrino, D., Ahmed, A. I. M. y Brunelli, E. 2021 Morphological and Molecular Alterations Induced by Lead in Embryos and Larvae of *Danio rerio*. *Applied Sciences*. 11:7464. doi:10.3390/APP11167464.
- de Abreu, M. S., Demin, K. A., Giacomini, A. C. V. V., Amstislavskaya, T. G., Strekalova, T., Maslov, G. O., Kositsin, Y., Petersen, E. V. y Kalueff, A. V. 2021. Understanding how stress responses and stress-related behaviors have evolved in

- zebrafish and mammals. *Neurobiology of Stress*. Elsevier Inc., 15. doi:10.1016/j.ynstr.2021.100405.
- De La Paz, J. F., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M. S. y Allende, M. L. 2017. Triazole Fungicides Inhibit Zebrafish Hatching by Blocking the Secretory Function of Hatching Gland Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 18:710. doi:10.3390/IJMS18040710.
- de Oliveira, A. A. S., Brigante, T. A. V. y Oliveira, D. P. 2021. Tail Coiling Assay in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos: Stage of Development, Promising Positive Control Candidates, and Selection of an Appropriate Organic Solvent for Screening of Developmental Neurotoxicity (DNT). *Water*. 13:119. doi:10.3390/W13020119.
- de Souza, A. M., da Silva Junior, F. C., Dantas, É. D., Galvão-Pereira, M. C., de Medeiros, S. R. B. y Luchiari, A. C. 2025. Temperature effects on development and life-long behavior in zebrafish. *Science of The Total Environment*. Elsevier, 973, p. 179172. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2025.179172.
- Demin, K. A., Taranov, A. S., Ilyin, N. P., Lakstygai, A. M., Volgin, A. D., de Abreu, M. S., Strekalova, T. y Kalueff, A. V. 2021. Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish. *Stress*. Taylor and Francis Ltd., 24(1), pp. 1-18. doi:10.1080/10253890.2020.1724948.
- Dorey, K. y Amaya, E. 2010. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development*. The Company of Biologists, 137(22), pp. 3731- 3742. doi:10.1242/DEV.037689.
- Eachus, H., Choi, M. K. y Ryu, S. 2021. The Effects of Early Life Stress on the Brain and Behaviour: Insights From Zebrafish Models. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A., 9, p. 657591. doi:10.3389/FCELL.2021.657591/XML/NLM.
- Elabd, S., Jabeen, N. A., Gerber, V., Peravali, R., Bourdon J. C., Kancherla, S., Vallone, D. y Blattner, C. 2019. Delay in development and behavioural abnormalities in the absence of p53 in zebrafish. *PLOS ONE*. Public Library of Science, 14(7), p. e0220069. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0220069.
- Feugere, L., Bates, A., Emagbetere, T., Chapman, E., Malcolm, L. E., Bulmer, K., Hardege, J., Beltran-Alvarez, P. y Wollenberg Valero, K. C. 2023. Heat induces multiomic and phenotypic stress propagation in zebrafish embryos. *PNAS Nexus*. Oxford Academic, 2(5), pp. 1-14. doi:10.1093/PNASNEXUS/PGAD137.
- Feugere, L., Scott, V. F., Rodriguez-Barucg, Q., Beltran-Alvarez, P. y Wollenberg Valero, K. C. 2021. Thermal stress induces a positive phenotypic and molecular feedback loop in zebrafish embryos. *Journal of Thermal Biology*. Elsevier Ltd, 102. doi:10.1016/j.jtherbio.2021.103114.
- Gilbert, S. F. 2000. Fertilization: Beginning a new organism. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts (MA), EE. UU.
- Gilbert, S. F. 2000. Life cycles and the evolution of developmental patterns. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts (MA), EE. UU.

- Haapanen-Saaristo, A. M., Virtanen, N., Tcarenkova, E., Vaparanta, K., Ampuja, M., Vehniäinen, E. R. y Paatero, Y. 2024. Heat stress sensitizes zebrafish embryos to neurological and cardiac toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier B.V., 733. doi:10.1016/j.bbrc.2024.150682.
- Herman, J. P. 2013. Neural control of chronic stress adaptation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Front Behav Neurosci, 7(MAY). doi:10.3389/FNBEH.2013.00061.
- Hisaoka, K. K. y Firlit, C. F. 1962). Ovarian Cycle and Egg Production in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Copeia*. JSTOR, 1962(4), p. 788. doi:10.2307/1440680.
- Ignatius, M. S. y Langenau, D. M. 2011. Fluorescent Imaging of Cancer in Zebrafish. *Methods in Cell Biology*. Academic Press Inc., 105, pp. 437-459. doi:10.1016/B978-0-12-381320-6.00019-9.
- Istiaque, A. y Khan, S. I. 2018. Impact of Ambient Temperature on Electricity Demand of Dhaka City of Bangladesh. *Energy and Power Engineering*. Scientific Research Publishing, Inc, 10(07), pp. 319-331. doi:10.4236/EPE.2018.107020.
- Itoh, N. 2007. The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: Their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30(10), pp. 1819-1825. doi:10.1248/BPB.30.1819.
- Kagias, K., Nehammer, C. y Pocock, R. 2012. Neuronal responses to physiological stress. *Frontiers in Genetics*. Frontiers, 3(OCT), p. 30910. doi:10.3389/FGENE.2012.00222/XML/NLM.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. y Schilling, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish, *Developmental Dynamics*. 203:253-310. doi:10.1002/AJA.1002030302.
- Lawrence, C., Sanders, G. E., Varga, Z. M., Baumann, D. P., Freeman, A., Baur, B. y Francis, M. 2010. Regulatory Compliance and the Zebrafish. *LibertPub*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 6(4), pp. 453-456. doi:10.1089/ZEB.2009.0595.
- Li, J., Zhang, Y., Liu, K., He, Q., Sun, C., Han, J., Han, L. y Tian, Q. 2018. Xiaoaiping induces developmental toxicity in zebrafish embryos through activation of ER stress, apoptosis and the Wnt pathway. *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A., 9(NOV), p. 1250. doi:10.3389/FPHAR.2018.01250.
- Miller, A., Schröder, K. L., Braun, K. E., Steindorf, C., Ottermanns, R., Roß- Nickoll, M., Hollert, H. y Backhaus, T. 2025. Temperature-dependence of Early Development of Zebrafish and the Consequences for Laboratory Use and Animal Welfare. *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 2025.02.13.638062. doi:10.1101/2025.02.13.638062.
- Muhr, J., Arbor, T. C. y Ackerman, K. M. 2023. Embryology, Gastrulation. *StatPearls*. StatPearls Publishing. Treasure Island, Florida (FL), EEUU.
- Nakai, A. y Ishikawa, T. 2001. Cell cycle transition under stress conditions controlled by vertebrate heat shock factors. *The EMBO Journal*. John Wiley

- & Sons, Ltd Chichester, UK, 20(11), pp. 2885-2895. doi:10.1093/EMBOJ/20.11.2885.
- Ng, A. N. Y., De Jong-Curtain, T. A., Mawdsley, D. J., White, S. J., Shin, J., Appel, B., Si Dong, P. D., Stainier, D. Y. R. y Heath, J. K. 2005. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Developmental Biology*. Academic Press, 286(1), pp. 114-135. doi:10.1016/J.YD-BIO.2005.07.013.
- Nunes, M. E. M., Schimith, L. E., Costa-Silva, D. G., Leandro, L. P., Martin I. K., De Mello, R. S., Nunes, F. V. M., Santer, M., Vieira, P. B., Posser, T. y Franco, J. L. 2020. Acute embryonic exposure of zebrafish to permethrin induces behavioral changes related to anxiety and aggressiveness in adulthood. *Journal of Psychiatric Research*. Elsevier Ltd, 121, pp. 91-100. doi:10.1016/j.jpsychires.2019.11.006.
- Pype, C., Verbueken, E., Saad, M. A., Casteleyn, C. R., Van Ginneken, C. J., Knapen, D. y Van Cruchten, S. J. 2015. Incubation at 32.5°C and above causes malformations in the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology*. Elsevier Inc., 56, pp. 56-63. doi:10.1016/j.reprotox.2015.05.006.
- Rohde, L. A. y Heisenberg, C. P. 2007. Zebrafish Gastrulation: Cell Movements, Signals, and Mechanisms. *International Review of Cytology*. Academic Press, 261, pp. 159-192. doi:10.1016/S0074-7696(07)61004-3.
- Schnurr, M. E., Yin, Y. y Scott, G. R. 2014. Temperature during embryonic development has persistent effects on metabolic enzymes in the muscle of zebrafish. *Journal of Experimental Biology*. Company of Biologists Ltd, 217(8), pp. 1370-1380. doi:10.1242/jeb.094037
- Schreck, C. B. y Tort, L. 2016. The Concept of Stress in Fish. *Fish Physiology*. Academic Press, 35, pp. 1-34. doi:10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1.
- Solnica-Krezel, L. 2006. Gastrulation in zebrafish - all just about adhesion? *Current Opinion in Genetics and Development*. 16(4), pp. 433-441. doi:10.1016/j.gde.2006.06.009.
- Thisse, B. y Thisse, C. 2005. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology*. Academic Press Inc., 287(2), pp. 390-402. doi:10.1016/j.ydbio.2005.09.011.
- Unión Europea. 2010. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, (276), pp. 33-79.
- Valcarce, D. G., Sellés-Egea, A., Riesco, M. F., De Garnica, M. G., Martínez- Fernández, B., Herráez, M. P. y Robles, V. 2024. Early stress exposure on zebrafish development: effects on survival, malformations and molecular alterations. *Fish Physiology and Biochemistry*. Springer Science and Business Media B.V., 50(4), pp. 1545-1562. doi:10.1007/S10695-024-01355-0/METRICS.
- Westerfield, M. 2000. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.

Zindler, F., Beedgen, F., Brandt, D., Steiner, M., Stengel, D., Baumann, L. y Braunbeck, T. 2019. Analysis of tail coiling activity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Academic Press, 186. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109754.