

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Efectos de los xantatos en el desarrollo del sistema cardiovascular del pez
cebra (*Danio rerio*)**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias
Biológicas**

Francis Ruano-Rivadeneira.

Quito, 2023.

A mi familia, quienes me apoyan en cada paso que doy

A mi madre, la que me alumbra y me apoya en mis disparates

A mi padre, por enseñarme a siempre ir hacia delante y nunca retroceder

A mis hermanas, por compartir memorias de la infancia y sueños de la adultez

Y a los técnicos del laboratorio y aquellas personas con las que he entablado una buena amistad, por la paciencia y determinación que me han ayudado a cumplir mi sueño.

Efectos de los xantatos en el desarrollo del sistema cardiovascular del pez cebra (*Danio rerio*)

Effects of xanthates on the development of the cardiovascular system of zebrafish (*Danio rerio*).

Autores: Francis Ruano-Rivadeneira^{1, 1} y Andrés Romero-Carvajal^{1, 2}

¹ Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador

¹ fmruano@puce.edu.ec

² maromero@puce.edu.ec

RESUMEN

El xantato amílico de potasio (PAX) es uno de los colectores más utilizados para la extracción minera. A pesar de que ha habido descripciones sobre lo abrasivo que llega hacer este químico para los ecosistemas y los organismos, los estudios sobre los efectos del PAX durante el desarrollo embrionario son escasos y en parte controversiales. En este estudio, mediante el uso de embriones de pez cebra como modelo experimental, se describen los efectos del xantato amílico de potasio sobre el desarrollo del sistema cardiovascular. A través de ensayos teratogénicos e inmunodetección se encontró que el PAX provoca un defecto en la formación del bucle cardíaco y, a concentraciones mayores, los embriones presentan un corazón anormal caracterizado por una morfología estirada en comparación a un corazón normal que tiene una morfología de “S”. Al comparar los efectos en el bucle cardiaco de cada concentración con el control los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas en los embriones tratados a concentraciones altas de PAX, demostrando que existe un efecto negativo en el desarrollo del sistema cardiovascular. Estos datos señalan que el xantato amílico de potasio conduce al deterioro de la morfogénesis del sistema cardiovascular, lo que sugiere la precaución en el uso de estas sustancias químicas.

Palabras clave: xantato amílico de potasio, sistema cardiovascular, bucle cardíaco, pez cebra, desarrollo embrionario.

ABSTRACT

Potassium amyl xanthate (PAX) is one of the most widely used collectors for mining. Although there have been descriptions of how abrasive this chemical is to ecosystems and organisms, studies on the effects of PAX during development are scarce and partly controversial. In this study, using zebrafish embryos as an experimental model, we describe the effects of potassium amyl xanthate on the development of the cardiovascular system. Through teratogenic and immunodetection assays it was found that PAX causes a defect in the formation of the cardiac loop and, at higher concentrations, the embryos present an abnormal heart characterized by a stretched morphology compared to a normal heart that has an S morphology. When comparing the effects on the cardiac loop of each concentration with the control, statistical analyses showed significant differences in embryos treated with high concentrations of PAX, demonstrating that there is a negative effect on the development of the cardiovascular system. These results indicate that potassium amyl xanthate leads to impaired morphogenesis of the cardiovascular system, suggesting caution in the use of these chemicals.

Key words: potassium amyl xanthate, cardiovascular system, cardiac loop, zebrafish, embryonic development.

INTRODUCCIÓN

El pez cebra (*Danio rerio*) es considerado un organismo versátil y útil en estudios biomédicos, genéticos, fisiológicos y ecológicos (Howe *et al.*, 2013). El motivo por el cual es ampliamente utilizado radica en varias características propias del animal, que facilitan su observación y manejo. Su fácil reproducción y mantenimiento, así como su rápido desarrollo embrionario, permite la visualización de embriones translúcidos y la existencia de procesos celulares similares a organismos más complejos (Kimmel *et al.*, 1995; Teame *et al.*, 2019).

En la actualidad, el uso del pez cebra como organismo modelo, ha permitido la realización de varias investigaciones en desarrollo embrionario, aplicando sustancias químicas externas, que producen alteraciones estructurales en el pez cebra (Legradi, 2015). Además, Rosas-Ramírez y colaboradores (2022), han evidenciado efectos teratogénicos responsables de anomalías craneofaciales, hipopigmentación y la muerte en el embrión, después de aplicar fármacos como paracetamol y ciprofloxacina. Otros estudios han mostrado, como determinados medicamentos pueden afectar el corazón, aumentando el tamaño del ventrículo, ya sea por hipertrofia, hiperplasia, o insuficiencia cardíaca, y son capaces de provocar edemas, arritmias y disfunción en la remodelación cardíaca (Zhu *et al.*, 2014; Paavola *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019; Paavola *et al.*, 2020).

La diversidad de estudios cardiotóxicos realizados en el pez cebra ha permitido la evaluación y comparación de las respuestas presentes en diferentes vertebrados (Thisse y Zon, 2002; Langheinrich *et al.*, 2003). Por ejemplo, se han comparado los efectos teratogénicos del pez cebra con los efectos que resultaron al utilizar las mismas sustancias en humanos o en ratones, obteniendo alteraciones estructurales similares y pulsaciones irregulares. Zhu *et al.*, (2014) y Jarque *et al.*,

(2020) han apoyado la comparación de dichos efectos al obtener valores mayores al 80% en especificidad y precisión al momento de realizar el análisis.

Las sustancias utilizadas para la extracción de minerales y metales pesados pueden provocar anomalías durante el desarrollo embrionario de los vertebrados (Aitio *et al.*, 2015). El ferrosilicio, por sus compuestos, provoca daño en la formación de los pulmones y un desarrollo anormal del corazón y riñones (Aitio *et al.*, 2015; Jin y Berlin, 2015; Batch *et al.*, 2016). El cianuro y mercurio, más utilizados para la extracción del oro, cobre y plata, causan síndrome nefrótico en el riñón, daño en las células endoteliales vasculares que permiten la circulación de la sangre y sistema nervioso (Barregard *et al.*, 2015; Lucchini *et al.*, 2015; Sjögren *et al.*, 2015).

Una de las sustancias más utilizadas para la separación de sulfuros metálicos en la minería son los xantatos, elemento utilizado para realizar análisis de concentraciones letales en animales, empleado en embriones de ranas, peces, pulga de agua, entre otros (Batch *et al.*, 2016). Los compuestos que se forman por la degradación natural de los xantatos tienen un gran impacto en la salud como el caso del disulfuro de carbono (Xu *et al.*, 1988). Investigaciones indican como la exposición a este derivado de xantato puede causar daños en la salud de los humanos: la producción de las células sexuales masculinas presentó una baja integridad de la membrana acrosómica, deformación del espermatozoide y menor vitalidad de estos; y una cardiotoxicidad causa daños en las arterias coronarias provocando así la disminución del flujo sanguíneo y falta de oxígeno (Meyer, 1981; Guo *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2022).

Por otro lado, en mamíferos como ratones, ratas y conejos, este puede afectar a la frecuencia cardíaca e intercambio de gases al causar una oclusión en las arterias coronarias, deformación de los alvéolos e incluso necrosis pulmonar. Además, se ha visto que el disulfuro de carbono provoca cambios en el citoesqueleto del cerebro, lo que conlleva a convulsiones, degeneración

neuromuscular, desmielinización, cambios comportamentales y parálisis (Abadin y Liccione, 1996; Song *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2022).

A pesar de tener una gran variedad de información sobre efectos teratogénicos causados por fármacos utilizados para la salud humana y sustancias químicas que son expuestas a varios organismos, no se ha reportado cómo los xantatos afectan el desarrollo embrionario del corazón en el pez cebra. En este sentido, la presente investigación se enfocará en el estudio de malformaciones en el desarrollo embrionario del corazón causados por el xantato amílico de potasio en el organismo modelo pez cebra. La metodología establecida en esta investigación permitirá describir y evaluar los efectos que causan los xantatos amílicos de potasio en la estructura embrionaria del corazón, posibilitando la visualización de alteraciones en la estructura cardiológica en vertebrados, y contribuir al cuerpo de conocimiento en la ontogenia de *Danio rerio*.

METODOLOGÍA

Obtención y cuidado de embriones

Los embriones utilizados fueron obtenidos del Bioterio para la Investigación del Pez Cebra (BIPC-PUCE), perteneciente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Embriones de pez cebra: exposición al xantato

Las concentraciones de xantato que se ocuparon para los tratamientos son: 12, 24, 36, 48 y 60 mg/L tomando como referencia el estudio de Villaverde (2023). Se trabajó con un set experimental de 5 tratamientos y un grupo control. Para cada set, se seleccionaron 12 embriones los cuales fueron repartidos en una placa de microtitulación de 24 pocillos (Costar 24-Well Cell Culture Cluster). Los embriones escogidos tuvieron una exposición durante 3 días a diferentes

concentraciones del xantato amílico de potasio en cada pocillo y fueron incubados a 28°C durante el periodo de exposición. Además, se cambió la solución de E2 con amílico de potasio para evitar que se evapore. Después de este periodo, se pasó a todos los embriones a un tubo de microcentrífuga con PFA al 4% para su fijación. Finalmente, se reemplazó de forma gradual el PFA por metanol al 100% para su deshidratación y realizar la inmunotinción.

Inmunotinción de tejido muscular

Los embriones almacenados en metanol al 100% fueron rehidratados progresivamente con PBS-Triton 1X (25%, 50%, 75%, 100%) durante 5 minutos para cada concentración. A continuación, se realizaron 2 lavados de PBS-Tr 1X en un lapso de 5 minutos, seguido de un lavado de 1 hora en agua destilada a temperatura ambiente y en movimiento. Se cambió el agua destilada por acetona fría a -20°C durante 7 minutos. Posteriormente, se hicieron 2 lavados de 5 minutos con PBS-Tr 1X en movimiento. Luego, se colocó la solución de bloqueo en movimiento y a temperatura ambiente durante 1 hora. El anticuerpo primario monoclonal Anti-Myosin (SIGMA) se colocó diluido en la solución de bloqueo en una proporción de 1: 20 y se incubaron las larvas en el anticuerpo primario en agitación circular por 1 hora a temperatura ambiental y se dejó reposar a 4°C durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas, se lavó el anticuerpo primario con 8 lavados de PBS-Tr 1X durante 20 minutos cada uno y se colocó el anticuerpo secundario anti-mouse IgG rojo (SIGMA) diluido (1 : 500) en solución de bloqueo (1h a temperatura ambiente y 24h a 4°C). Después de remover el anticuerpo secundario, se hicieron 4 lavados de PBS-Tr de 20 minutos y se colocó DAPI disuelto en PBS 1X (1: 1000) durante 1h30min a temperatura ambiente y en movimiento. Finalmente, se

realizaron dos lavados 2 lavados de PBS-Tr seguido de 2 lavados de PBS 1X durante 10 min cada lavado y se postfijó a los embriones en PFA al 4%.

Imagen y análisis estadísticos

Para la observación de la inmunotinción se seleccionaron 21 larvas al azar por cada concentración y se realizó un corte en bisel en la nuca y en la vejiga natatoria para mayor facilidad en el montaje. Las larvas fueron examinadas en vista ventral mediante el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ni con magnificación 10x, utilizando la cámara Mshot Ms60 y el programa Mshot Image Analysis System. Se realizó un montaje de las imágenes en Image J empleando la herramienta Z-project para la descripción del efecto provocado en el corazón por el xantato amílico de potasio.

El análisis estadístico se realizó mediante R studio, se ejecutó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto del xantato en la presencia del bucle cardíaco. Además, se hizo un histograma para evaluar la frecuencia de la formación del bucle cardíaco en cada concentración (RStudio Team, 2020).

RESULTADOS

Impactos en la estructura del corazón

Los ensayos teratógenos realizados con el xantato amílico de potasio en distintas concentraciones mostraron que hay un efecto en el desarrollo del corazón, sobre todo en la morfología del ventrículo y aurícula. En todos los embriones que no se realizaron tratamientos se presenta una morfología normal en el corazón (Fig. 1A). En el caso de los embriones expuestos al xantato, después de 3 días post fecundación (dpf) en las concentraciones de 12 mg/L y 24 mg/L se puede

observar un retraso en la flexión del corazón. Aun así, se logran distinguir 3 segmentos con estructura definida como ventrículo, bucle cardíaco y aurícula (Fig. 1B, 1C). Por otro lado, la exposición a 36 mg/L, 48 mg/L y 60 mg/L provocó una anomalía en la forma del corazón, al presentar deformaciones en el ventrículo y aurícula (Fig. 1D, 1E). Además, en algunos embriones después de los 3dpf de exposición al xantato no se logró diferenciar la aurícula del ventrículo (Fig. 1D) e incluso se distingue un retraso en la formación de la aurícula, lo que impide que la inmutación sea predominante en esta estructura (Fig. 1E, 1F).

Todos los embriones de control presentan formación del bucle cardíaco con la superposición del ventrículo y la aurícula (Fig. 2A-A``). A medida que aumenta la concentración del PXA, el corazón sufre cambios en sus estructuras, presentando una disminución en la presencia del bucle cardíaco y por ende la flexión del corazón. En la concentración de 12 mg/L y 24 mg/L más de la mitad de los embriones lograron formar el bucle cardíaco (Fig. 2B-B``, 2C-C``). Con respecto a concentraciones mayores a 24 mg/L la mayoría de los embriones mostraron una falla en la formación del bucle, lo que resulta en un corazón lineal con una aurícula estirada o una aurícula incompleta (Fig. 2D-2F``). Esto sugiere que en xantato amílico de potasio puede retrasar la correcta formación del bucle cardíaco y aurícula.

En el análisis estadístico ANOVA, al comparar los efectos de las concentraciones en la presencia del bucle cardíaco con el control, se obtuvo un P menor a 0,05 en los tratamientos realizados, lo que sugiere la existencia de una diferencia significativa principalmente en los tratamientos de 36 mg/L, 48 mg/L y 60 mg/L. Además, lo antes mencionado sugiere que la presencia de un bucle cardíaco y flexión del corazón disminuye en los embriones tratados con una concentración mayor (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de este trabajo señalan la existencia de efectos negativos en el desarrollo embrionario del corazón, que son causados por el xantato amílico de potasio. Se sabe que los xantatos son los colectores más utilizados en la minería para el proceso de extracción de minerales (Batch *et al.*, 2016), llegando a ocupar únicamente la mitad de esta sustancia, mientras lo restante es desechado en los relaves, provocando ecotoxicidad y problemas en la salud humana (Fu *et al.*, 2020; MSDS, 2021).

Investigaciones previas han resaltado el efecto de los xantatos en animales acuáticos. Estudios realizados por Villaverde (2023) evaluaron el efecto toxicológico y teratogénico del xantato amílico de potasio en embriones y larvas de pez cebra. Los embriones expuestos a diferentes concentraciones de esta sustancia presentaban un retraso en el desarrollo, al evidenciar una reducción del tamaño corporal, torsión de la cola, aumento de la yema y agrandamiento en la cavidad pericárdica (Villaverde, 2023).

Los resultados de esta investigación muestran que los tratamientos provocan un fallo en el proceso de flexión cardíaca lo que hace que los corazones no tengan una clara división o presencia de ambas cavidades (Fig 2D,2E, 2F). Esto sugiere que el xantato amílico de potasio podría estar interfiriendo con una de las vías de señalización que regulan este proceso (Raya *et al.*, 2003). Tanto la vía de señalización *BMP* como *Nodal* son necesarias para la especificación y diferenciación del corazón, además de estar implicadas en la rotación del tubo cardíaco (Bakkers, 2011).

Algunos estudios realizados por Chocron *et al.*, (2007) y Smith *et al.*, (2008) muestran que la señalización *BMP4* expresada en el lado izquierdo del tubo cardíaco es la responsable de la migración de las células progenitoras y rotación cardíacas. Otros estudios muestran que la

expresión simétrica de *BMP4* o la inhibición de esta vía no permite la flexión del corazón, dando como resultado un corazón lineal (Chen *et al.*, 1997; Chocron *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008). Por otro lado, investigaciones realizadas en la vía *Nodal* indican que, sin la presencia de *Nodal* en conjunto con varios genes, los mecanismos responsables del bucle cardíaco no llegan a presentarse, lo que podría causar el fenotipo de un corazón lineal, edema pericárdico e insuficiencia cardíaca (Kim *et al.*, 2007; Noël *et al.*, 2013; Raya *et al.*, 2003).

Otras moléculas también provocan errores en la formación del corazón (Zhu *et al.*, 2014; Paavola *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019; Paavola *et al.*, 2020). La exposición a fármacos como la berberina produce un aumento en la incidencia de edemas pericárdicos y defectos en el bucle cardíaco en embriones de pez cebra cuando estos son expuestos a 100 mg/L (Martini *et al.*, 2020). Los fungicidas, como el Triclosan utilizados con regularidad en cultivos, afectan al correcto desarrollo y funcionamiento del sistema cardiovascular a concentraciones de 0.4 mg/L (Saley *et al.*, 2016). De la misma manera, este estudio demuestra cómo a concentraciones mayores de 24 mg/L del xantato amílico de potasio produce el mismo efecto que los estudios anteriormente indicados.

En este estudio demostramos que el xantato puede afectar el desarrollo embrionario y afectar los procesos en la morfogénesis del sistema cardiovascular. Además, se brinda información relevante para regular el uso de este compuesto en mineras y evitar efectos negativos en animales y humanos, que habiten en zonas cercanas a ríos o cerca de lugares donde se desechan esta clase de sustancias.

Nuestros resultados muestran el potencial impacto que el xantato y otras sustancias pueden modificar el ecosistema donde estas son comúnmente utilizadas. Por lo tanto, es vital la continuidad de estas investigaciones para buscar soluciones viables en el uso y tratamientos de estas zonas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadin, H., y Liccione, J. J. (1996). Toxicological profile for carbon disulfide.
- Aitio, A., Nordberg, M., y Santonen, T. (2015). Gold and Gold mining. En G. F. Nordberg y M. Costa (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals* (pp. 818–857). Elsevier
- Barregard, L., y Elinder, C. (2015). Renal Effects of Exposure to Metals. En G. F. Nordberg y M. Costa (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals* (pp. 333–348). Elsevier
- Batch, L., Nørregaard, R. D., Hansen, V., y Gustavson, K. (2016). Review on environmental risk assessment of mining chemicals used for mineral. *Scientific Report from DCE – Danish Centre for Environment and Energy*. <https://dce2.au.dk/pub/SR203.pdf>
- Bakkers, J. (2011). Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovascular Research*, 91(2), 279–288. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr098>
- Chen, J. N., van Eeden, F. J., Warren, K. S., Chin, A., Nüsslein-Volhard, C., Haffter, P., y Fishman, M. C. (1997). Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 124(21), 4373–4382. <https://doi.org/10.1242/dev.124.21.4373>
- Chocron, S., Verhoeven, M. C., Rentzsch, F., Hammerschmidt, M., y Bakkers, J. (2007). Zebrafish Bmp4 regulates left-right asymmetry at two distinct developmental time points. *Developmental Biology*, 305(2), 577–588. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.001>
- Fu, P., Wang, L., Ma, Y., y Hou, Z. (2020). A comparative study on the degradation of ethyl xanthate collector by O₃, UV254nm, UV185+254nm, O₃/UV254nm and

O3/UV185+254nm processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 103628. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103628>

Guo, Y., Ma, Y., Chen, G., y Cheng, J. (2016). The effects of occupational exposure of carbon disulfide on sexual hormones and semen quality of male workers from a chemical fiber factory. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 58(8), e294-300. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000823>

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

Jarque, S., Rubio-Brotons, M., Ibarra, J., Ordoñez, V., Dyballa, S., Miñana, R., y Terriente, J. (2020). Morphometric analysis of developing zebrafish embryos allows predicting teratogenicity modes of action in higher vertebrates. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 96, 337–348. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.08.004>.

Jin, T., y Berlin, M. (2015). Titanium. En *Handbook on the Toxicology of Metals* (pp. 1287–1296). Elsevier.

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: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

Kim, K.-H., Antkiewicz, D. S., Yan, L., Eliceiri, K. W., Heideman, W., Peterson, R. E., y Lee, Y. (2007). Lrrc10 is required for early heart development and function in zebrafish.

Developmental Biology, 308(2), 494–506. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.06.005>

Langheinrich, U., Vacun, G., y Wagner, T. (2003). Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 193(3), 370–382.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.07.012>

Legradi, J., el Abdellaoui, N., van Pomeran, M., y Legler, J. (2015). Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(21), 16277–16289. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3805-8>

Lucchini, R. G., Aschner, M., Bellinger, D. C., y Caito, S. W. (2015). Neurotoxicology of Metals.

En *Handbook on the Toxicology of Metals* (pp. 299–311). Elsevier

Martini, D., Pucci, C., Gabellini, C., Pellegrino, M., y Andreazzoli, M. (2020). Exposure to the natural alkaloid Berberine affects cardiovascular system morphogenesis and functionality during zebrafish development. *Scientific Reports*, 10(1), 17358.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73661-5>

Meyer, C. R. (1981). Semen quality in workers exposed to carbon disulfide compared to a control group from the same plant. *Journal of Occupational Medicine.: Official Publication of the Industrial Medical Association*, 23(6), 435–439. [https://doi.org/10.1097/00043764-](https://doi.org/10.1097/00043764-198106000-00018)

[198106000-00018](https://doi.org/10.1097/00043764-198106000-00018)

MSDS. (2021). Flottec PAX-90. *Flottec*. <https://flottec.mx/xantatos/pax-90.php>

- Noël, E. S., Verhoeven, M., Lagendijk, A. K., Tessadori, F., Smith, K., Choorapoikayil, S., den Hertog, J., y Bakkers, J. (2013). A Nodal-independent and tissue-intrinsic mechanism controls heart-looping chirality. *Nature Communications*, *4*(1), 2754.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3754>
- Paavola, J., Schliffke, S., Rossetti, S., Kuo, I. Y.-T., Yuan, S., Sun, Z., Harris, P. C., Torres, V. E., y Ehrlich, B. E. (2013). Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *58*, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.01.015>
- Paavola, J., Alakoski, T., Ulvila, J., Kilpiö, T., Sirén, J., Perttunen, S., Narumanchi, S., Wang, H., Lin, R., Porvari, K., Junttila, J., Huikuri, H., Immonen, K., Lakkisto, P., Magga, J., Tikkanen, I., y Kerkelä, R. (2020). Vezf1 regulates cardiac structure and contractile function. *EBioMedicine*, *51*(102608), 102608.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.102608>
- Raya, A., Kawakami, Y., Rodriguez-Esteban, C., Buscher, D., Koth, C. M., Itoh, T., Morita, M., Raya, R. M., Dubova, I., Bessa, J. G., de la Pompa, J. L., y Izpisua Belmonte, J. C. (2003). Notch activity induces Nodal expression and mediates the establishment of left-right asymmetry in vertebrate embryos. *Genes & Development*, *17*(10), 1213–1218.
<https://doi.org/10.1101/gad.1084403>
- Rosas-Ramírez, J. R., Orozco-Hernández, J. M., Elizalde-Velázquez, G. A., Raldúa, D., Islas-Flores, H., y Gómez-Oliván, L. M. (2022). Teratogenic effects induced by paracetamol, ciprofloxacin, and their mixture on *Danio rerio* embryos: Oxidative stress implications. *The*

Science of the Total Environment, 806(Pt 2), 150541.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150541>

RStudio Team (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC, Boston, MA URL.

<http://www.rstudio.com/>.

Saley, A., Hess, M., Miller, K., Howard, D., y King-Heiden, T. C. (2016). Cardiac toxicity of triclosan in developing zebrafish. *Zebrafish*, 13(5), 399–404.

<https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1257>

Sharma, A., Choudhary, S., Patel, B., y Kumar, S. (2022). Carbon Disulfide (CS₂) Exposure and Human Reproductive Health-A Narrative Overview. *Journal of Infertility and Reproductive Biology*, 10(2), 22-27

Sjögren, B., Bigert, C., y Gustavsson, P. (2015). Cardiovascular Disease. En *Handbook on the Toxicology of Metals* (pp. 313–331). Elsevier.

Smith, K. A., Chocron, S., von der Hardt, S., de Pater, E., Soufan, A., Bussmann, J., Schulte-Merker, S., Hammerschmidt, M., y Bakkers, J. (2008). Rotation and asymmetric development of the zebrafish heart requires directed migration of cardiac progenitor cells. *Developmental Cell*, 14(2), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.11.015>

Song, F., Yu, S., Zhao, X., Zhang, C., y Xie, K. (2006). Carbon disulfide-induced changes in cytoskeleton protein content of rat cerebral cortex. *Neurochemical Research*, 31(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-9140-1>

- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., y Zhou, Z. (2019). The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*, 9(3), 68–77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- Thisse, C., y Zon, L. I. (2002). Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5554), 457–462. <https://doi.org/10.1126/science.1063654>
- Villaverde, E. (2023). *Evaluación toxicológica y teratológica de xantatos de uso industrial utilizando embriones de pez cebra (Danio rerio)* [Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/21371/VILLAVERDE%20GOMEZ%20ESTIBALIZ%20MAITEA.pdf?sequence=1>
- Wang, J., Huertas-Vazquez, A., Wang, Y., y Lusic, A. J. (2019). Isoproterenol-induced cardiac diastolic dysfunction in mice: A systems genetics analysis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 100. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00100>
- Xu, Y., Lay, J. P., y Korte, F. (1988). Fate and effects of xanthates in laboratory freshwater systems. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(4–6), 683–689. <https://doi.org/10.1007/bf02021019>
- Zhu, Jun-Jing; Xu, Yi-Qiao; He, Jian-Hui; Yu, Hang-Ping; Huang, Chang-Jiang; Gao, Ji-Min; Dong, Qiao-Xiang; Xuan, Yao-Xian; Li, Chun-Qi (2014). *Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish*. *Journal of Applied Toxicology*, 34(2), 139–148. doi:10.1002/jat.2843

FIGURAS

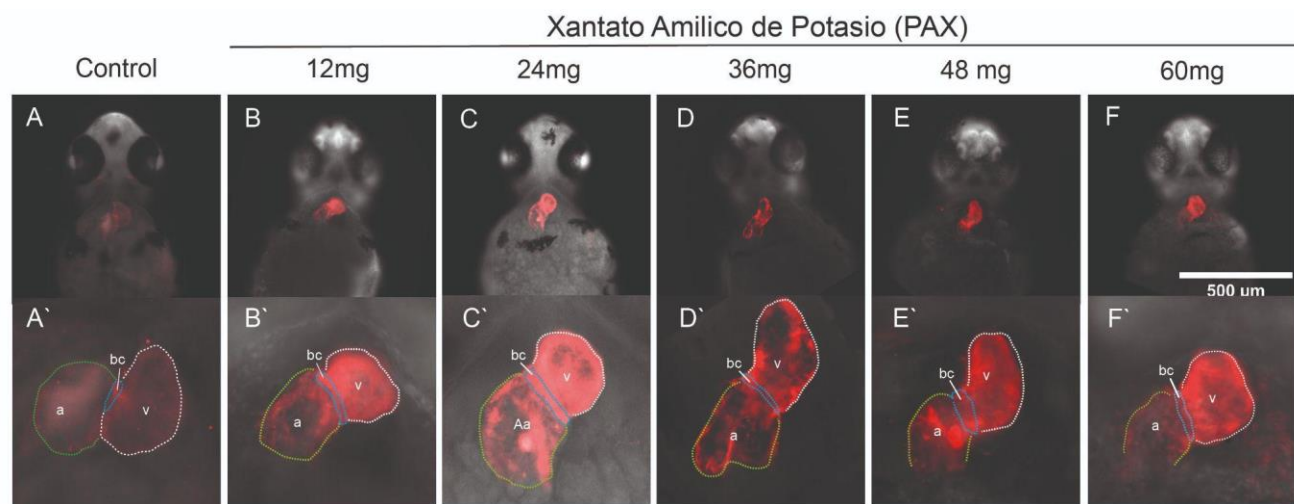


Figura 1. Vista ventral del corazón de *Danio rerio* 3dpf expuestos al xantato amílico de potasio. (A) larva control donde se observa la estructura normal del corazón (a). (A`) corazón del pez cebra con presencia de bucle cardíaco (bc) y la superposición de sus 2 cavidades superpuestas: ventrículo (v) con forma de frijol y aurícula (a) cilíndrica. (B) larva expuesta a 12mg/L de xantato amílico de potasio (PAX). (B`) corazón de la larva expuesta a 12 mg/L en el que presenta ligeros cambios. No presenta una superposición de la cavidad ventricular (v) con la auricular (a), ya que existe un retraso en el proceso de bucle cardíaco (bc). (C) larva expuesta a 24 mg/L del PAX. (C`) corazón del pez cebra expuesto a 24 mg/L de PAX, se distinguen las dos cavidades: ventrículo (v) más redondo y la una aurícula (a) en forma de gota. Además, se muestra un retraso en la formación de bucle cardíaco (bc). (D) Larva expuesta a 36 mg/L de PAX. (D`) corazón de la larva expuesta 36 mg/L, el ventrículo (v) no presenta la forma característica de frijol y se observa una aurícula (a) con forma anormal. Asimismo, no existe una superposición de estas dos cavidades ya que no se llega a dar el proceso de bucle cardíaco (bc). (E) larva expuesta a 48 mg/L de PAX. (E`) corazón de la larva expuesta a 48 mg/L muestra cambios en la forma del ventrículo (v) siendo este más

alargado y una aurícula (a) incompleta. No presenta una superposición de ambas cavidades.

(D) larva expuesta a 60 mg/L de PAX. (D`) el corazón muestra cambios en la forma del corazón. El ventrículo (v) se encuentra más redondo y existe un desarrollo incompleto de la aurícula (a). No se presenta una superposición de las cavidades.

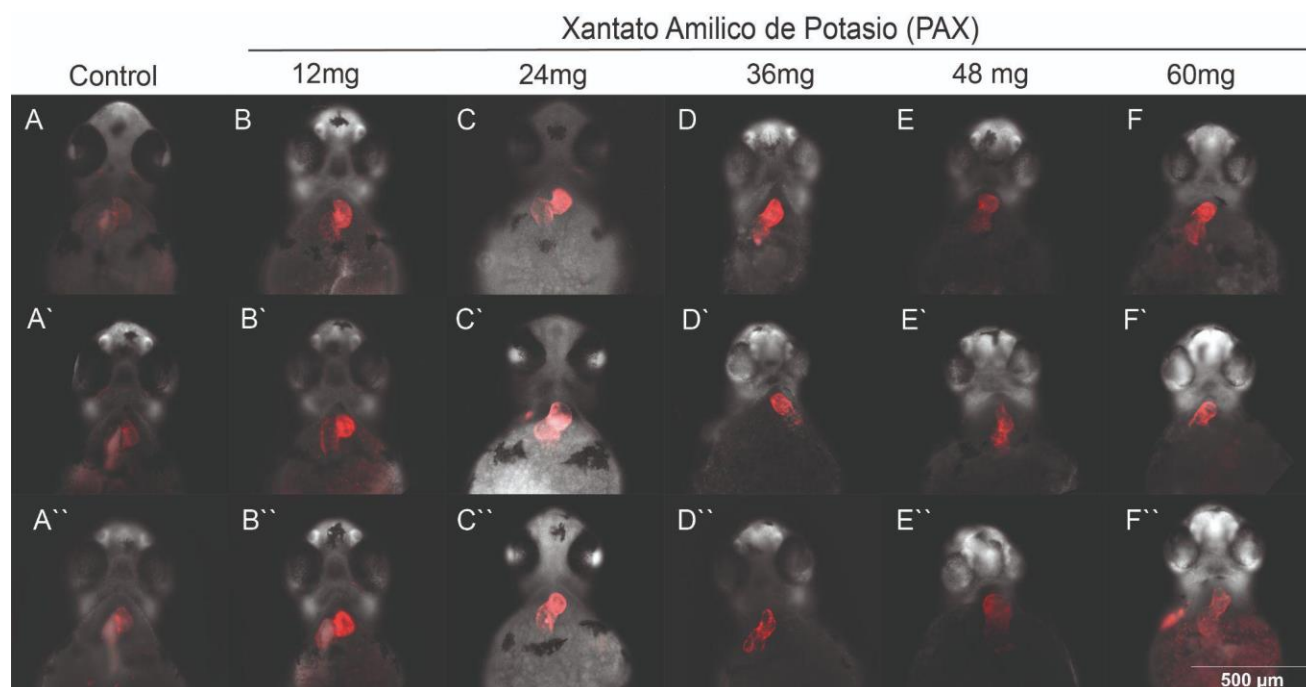


Figura 2. Disminución en la flexión cardiaca y presencia del bucle cardíaco en larvas 3dpf de la exposición al xantato amílico de potasio. (A-A'') larvas control de pez cebra muestran una superposición de la aurícula y ventrículo causada por la flexión cardiaca. (B-C'') en las larvas expuestas a 12 mg/L y 24 mg/L aún mantiene la forma de S por la torsión que sufre el corazón mediado el bucle cardíaco. (D-D'') las larvas presentan una disminución en la flexión cardiaca. (E-F'') revelan la ausencia de una flexión cardiaca y bucle cardíaco.

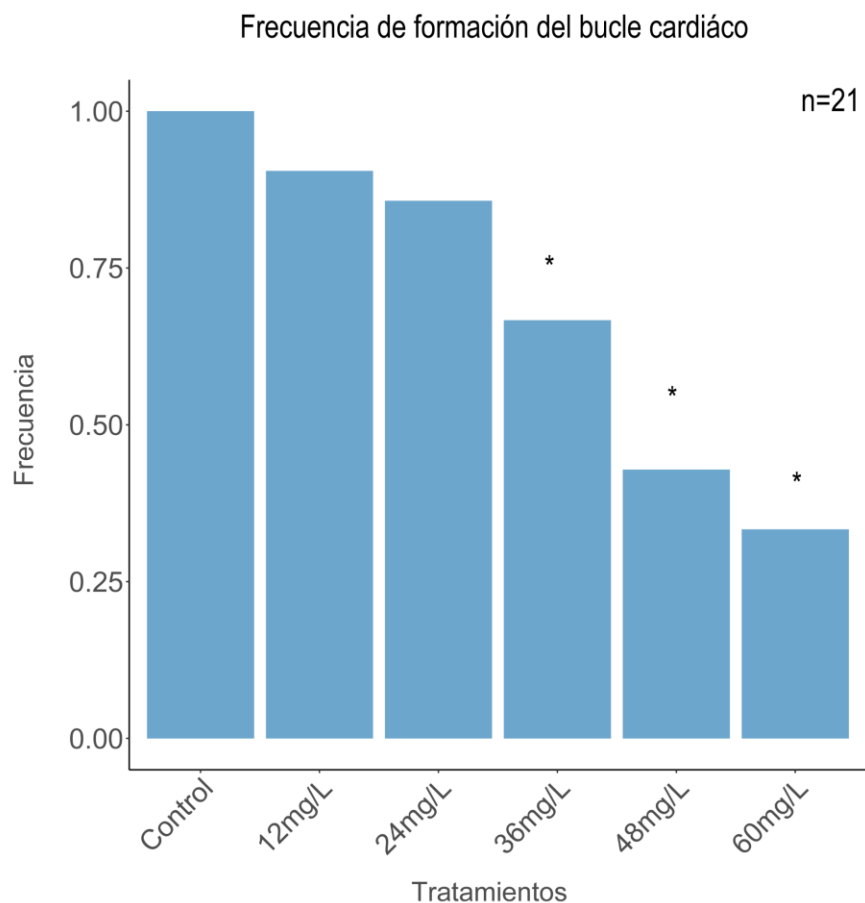


Figura 3. Frecuencia de formación del bucle cardíaco en larvas de 3dpf después de la exposición al PAX. Frecuencia de la presencia de flexión cardíaca mediada por bucle cardíaco en una muestra de 21 larvas en función de las concentraciones del xantato amfílico de potasio en comparación con el control. El eje “y” muestra la regularidad en la que los individuos tienen una correcta formación del bucle, donde 1 representa al total de larvas observadas y 0 la ausencia. En el eje “x” se muestran las concentraciones a las cuales las larvas fueron expuestas. Se demuestra que la formación del bucle cardíaco disminuye cuando hay un aumento en la concentración de xantato. A partir de la concentración de 36 mg/L la formación del bucle cardíaco disminuye significativamente ($p= 5.93e-08^{***}$) en comparación con el control donde todas las larvas presentan una formación correcta del bucle y flexión cardíaca.