

Trabajo Original

Toxicología Experimental

El ozono (O₃) reduce la afinidad tisular a la eritrosina en modelo larvario de Pez Cebra *Danio rerio*.

Álvarez, M¹., Perdomo, L., Navarro E.

¹Sección de Microscopia del Instituto Anatómico "José Izquierdo" de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela, 01053.

Resumen

La aplicación de colorantes vitales en modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*, constituye una eficiente estrategia metodológica para describir importantes blancos tisulares y celulares, así como para indagar sobre mecanismos fisiológicos, normales y patológicos, vinculados con la acción tóxica de xenobióticos. El objetivo de la presente investigación, fue evaluar las señales de toxicidad vinculadas con la acción tóxica del O₃, haciendo uso de la eritrosina, un colorante vital clasificado con grado alimenticio. Para ello, se hizo uso de larvas de pez cebra *Danio rerio* de 5 dpf, sometidas a una atmósfera de ozonización de 0,05 ppm, durante 15 minutos y seguidamente sumergidas en una solución 1% de eritrosina, durante 20 minutos en oscuridad. La ozonización indujo efectos tóxicos significativos caracterizados por la torsión de la aleta caudal en un 60% de la población larvaria tratada. Dicha región perdió la homogeneidad de la coloración con eritrosina registrándose una dislocación del brillo de la fluorescencia, reflejado en un histograma con picos de intensidad reducida en comparación con el control. De acuerdo a los resultados expuestos resulta evidente que una disminución en la intensidad de reacción a la eritrosina pudiera ser parte de la respuesta tóxica del tejido de la región caudal a la acción del O₃, vinculada con una pérdida de la citoarquitectura de dicha región, puesta en evidencia a través cambios en la afinidad del colorante vital.

Palabras claves: Ozono (O₃), Eritrosina, Larvas de Pez cebra *Danio rerio*.

Summary

Ozone (O₃) reduces erythrocin affinity tissue in Zebrafish *Danio rerio* larval model

The application of vital dyes on larval model of zebrafish *Danio rerio* constitutes an efficient methodological strategy to describe important tissue and cellular targets, as well as to investigate physiological, normal and pathological mechanisms, linked to the toxic action of xenobiotic. The aim work was to evaluate the signs of toxicity associated with the toxic action of O₃, making use of erythrosine, a vital dye classified with nutritional grade. For this purpose, larvae of *Danio rerio* zebrafish of 5 dpf, subjected to an ozonation atmosphere of 0.05 ppm for 15 min were used and then submerged in a 1% solution of erythrosine for 20 min in the dark. Ozonization induced significant toxic effects characterized by torsion of the caudal fin in 60% of the treated larval population. This region lost the homogeneity of staining with erythrosine with a dislocation of fluorescence brightness reflected in a histogram with reduced intensity peaks compared to the control. According to the results, it is evident that a decrease in the intensity of reaction to erythrosine could be part of the toxic response of the tissue of the caudal region to the action of O₃, linked to a loss of the cytoarchitecture of said region, placed in evidence through changes in the affinity of the vital dye.

Key words: Ozone (O₃), Erythrosine, Zebrafish Larvae *Danio rerio*

Introducción

La eficacia, así como los daños inducidos por el ozono (O_3), son aspecto de este poderoso agente oxidante que han sido evaluados en modelo larvario de pez cebra *Danio rerio* y reportados por nuestro laboratorio en investigaciones previas¹. El estudio sobre poblaciones larvarias de este eficiente modelo experimental expuesto a distintos ambientes de O_3 , ha permitido ilustrar la toxicidad del O_3 , como un proceso dependiente del tiempo de exposición así como de la concentración. Sin embargo, poco ha sido reportado respecto a los posibles mecanismos vinculados con dicho proceso. Por otra parte cabe destacar que en el modelo experimental de pez cebra, la aplicación de colorantes con propiedades fluorescentes, ha demostrado ser una herramienta útil para la obtención de imágenes de tejidos y estructuras subcelulares². En los últimos años, los colorantes vitales y las sondas fluorescentes han recibido considerable atención debido a su potencial para estudiar su quimio-sensibilidad; de hecho, se ha desarrollado una biblioteca de compuestos fluorescentes para la detección y etiquetado específico de las estructuras larvarias en dicho modelo³. Esto ha permitido evaluar pequeñas sustancias químicas que simplemente añadidas en el agua, son directamente absorbidas⁴. En el presente trabajo se hizo uso del colorante vital conocido como eritrosina⁵, para indagar sobre aquellas posibles estructuras anatómicas que pudieran estar sirviendo de blanco a la acción del poder oxidativo del O_3 , una información que hasta donde conocemos, no se encuentra claramente establecida. La eritrosina es un colorante sintético, clasificado con grado alimenticio y también conocido como Rojo N° 3. Es una sal de tetraiodo, hidrofílica que ha sido reconocida como un colorante de fondo que tiñe el citoplasma, el tejido conjuntivo y las fibras de colágeno, además de acumularse en lisosomas y mitocondrias⁶.

Materiales y métodos

Tratamiento con Ozono (O_3)

Larvas de 5 dpf, cultivadas en el laboratorio de Microscopia del Instituto Anatómico "José Izquierdo" de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, fueron colocadas en láminas portaobjetos en un volumen de 500 μ l de agua de pecera. El portaobjetos a su vez, fue colocado en una capsula de Petri y la misma, fue introducida en la cámara de ozonización durante 15 minutos, bajo una concentración de 0,05 ppm suministrada por un equipo Oxigen Y Plus Desinfectador, de una potencia de 18W y una producción de 500mg/h, de acuerdo a protocolo desarrollado en el laboratorio. Otro grupo larvario estuvo colocado fuera de la cámara de ionización y fue considerado como el grupo control. Una vez transcurrido 15 min de exposición al ambiente ozonizado,

ambos grupos larvarios, controles y tratados, fueron sumergidos durante 20 minutos bajo oscuridad, en 1 ml de solución, clara y homogénea, de eritrosina 1% (p / v) de polvo de eritrosina (Sigma Ltd., Poole, UK) disuelto en agua destilada; periodo después del cual fueron lavadas con abundante agua de pecera, durante 10 min y seguidamente fueron colocadas bajo del Microscopio invertido Olympus IX71 para ser observados bajo luz fluorescente de emisión de 540 nm y fotografiados con cámara digital DPX50. La intensidad de la fluorescencia, en grupos controles y tratados, fue estimada a través histogramas de densidad, obtenidos con el Programa ImageJ, de análisis de imágenes.

Resultados

La ozonización de la población larvaria de pez cebrá *Danio rerio* durante 15 minutos de exposición, indujo efectos tóxicos significativos en un 60% de las larvas tratadas. En comparación con los controles (Fig.2a), se pudo observar en las larvas ozonizadas (Fig.2b), que dicho efecto se expresó con la torsión de la aleta caudal (flechas). Por otra parte, dicha región en las larvas controles (Fig.2a'), presentó una homogénea coloración con eritrosina y un uniforme brillo fluorescente (Fig.2a''), con un histograma de tres picos de intensidad bien definidos (Fig.2a'''). No fue así en las larvas ionizadas (Fig.2b), en donde dicha región perdió la homogeneidad de la coloración con eritrosina (Fig.2b'), registrándose una dislocación del brillo de la fluorescencia emitida por el colorante (Fig.2b'') y un histograma de menor cantidad de picos de intensidad de fluorescencia (Fig.2b'''). La inocuidad de la eritrosina fue corroborada.

Discusión

Los resultados obtenidos permitieron corroborar que la aplicación de colorantes vitales en modelo larvario de pez cebrá *Danio rerio*, particularmente como la eritrosina, constituye una eficiente estrategia metodológica para describir importantes blancos tisulares y celulares, así como indagar sobre mecanismos fisiológicos, normales y patológicos⁷ vinculados con la acción tóxica de cierto número de agentes xenobióticos como el gas O₃. Simplemente añadidos en el agua, pudo ser absorbidos por la población larvaria una vez sumergidas en la solución adecuada como fue descrito en la presente investigación. Así, la eritrosina permitió destacar una región anatómica con alta capacidad regenerativa e intensa actividad motora⁸, como es la porción de la aleta caudal; entre otras. Debido a sus propiedades, dicha coloración caracterizó cierto contenido de tejido conectivo así como la presencia de fibras de colágeno y muy probablemente la ubicación de organelos subcelulares como mitocondrias y lisosomas, afines al colorante. Si alguno de estos elementos estuvo comprometido luego de aplicado el O₃, queda por ser verificado. Sin embargo, cabe destacar que la administración de O₃, dependiendo de la concentración

del gas, interviene con la organización del citoesqueleto, la actividad mitocondrial y la transcripción nuclear; actividades éstas, que pudieron verse afectadas de manera diferente debido a la alta concentración de O₃⁹. Altas concentraciones O₃ estimula el estrés oxidativo severo, a través de la activación del factor transcripcional nuclear kappa B, dando como resultado la respuesta inflamatoria y lesión tisular¹⁰. Por otra parte es sabido que las mitocondrias son muy sensibles al estrés oxidativo y, por lo tanto, representan un objetivo esperado para el O₃. En particular, el estrés oxidativo puede inducir la fisión mitocondrial y causar alteraciones en las enzimas mitocondriales de la cadena respiratoria¹¹. Si las condiciones experimentales propuesta en la presente investigación permitieron o no la activación, en modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*, de algunos de los eventos antes descritos, no fue posible demostrarlo. Sin embargo, una reducción en la tinción con eritrosina por parte de elementos estructurales de la región caudal de larvas de pez cebra *Danio rerio* tratadas con el ozono podrían sugerirlo. De acuerdo a los resultados expuestos resulta evidente que una disminución en la intensidad de reacción a la eritrosina, como respuesta toxica del O₃, pudiera ser la señal de una lesión tisular vinculada con una pérdida de la citoarquitectura de dicha región, puesta en evidencia a través del colorante vital.

Fig.1. Representación gráfica de la experimentación. Ozono (O₃), molécula de eritrosina. Larvas de pez cebra 5dpf. Región de la aleta caudal.

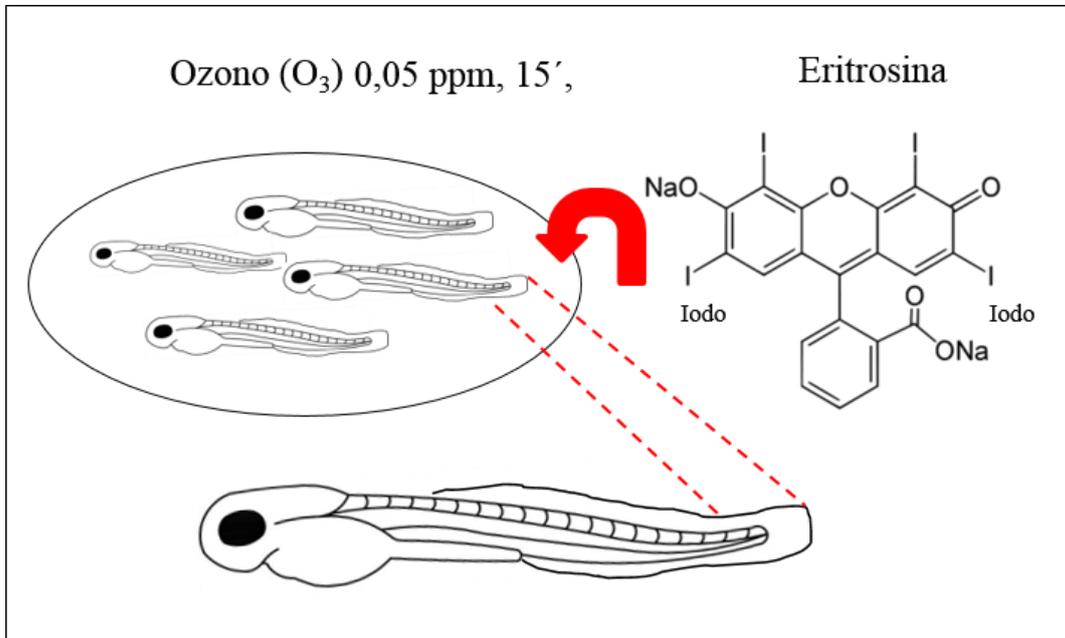
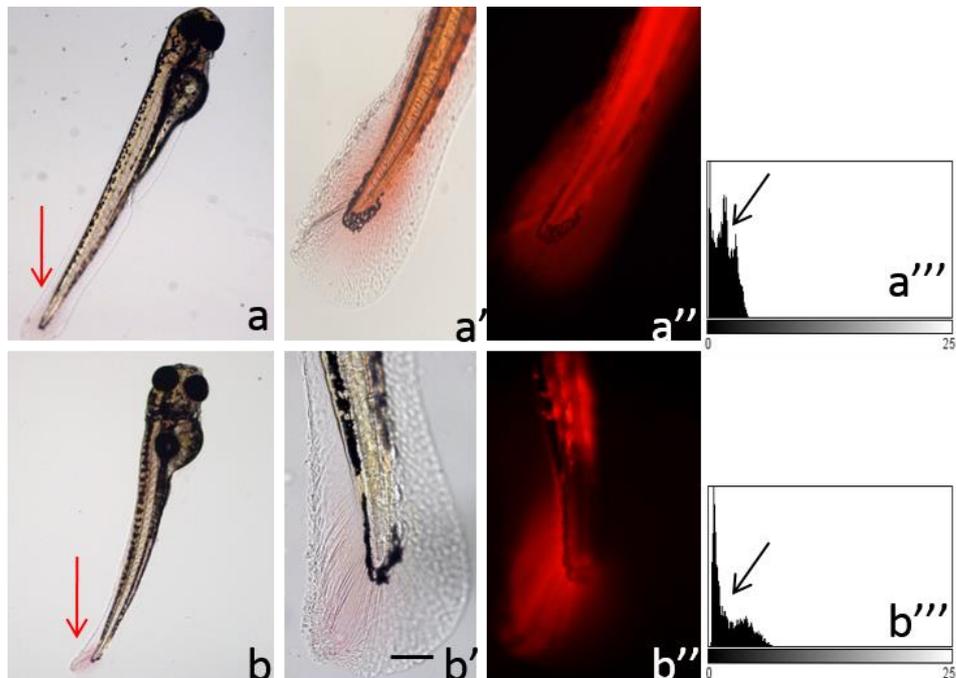


Fig.2. Efecto de la ozonización sobre la estructura caudal de larvas de pez cebra *Danio rerio*. Curvatura con pérdida de la intensidad del fluorocromo eritrosina. Barra = 100µm.



Referencias

1. Álvarez, M., Perdomo, L., Navarro E., Arias, M., Benítez, JM., Mikuski. Ozonización (O₃) en modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*. RETEL 2016; 46: 35-43.
2. Álvarez M, Perdomo L, Navarro E, Arias M. Rojo Congo y el tránsito gastrointestinal en larvas del pez cebra. RETEL 2017; 49: 19-27.
3. Veronika Sander, Shantanu Patke, Jung Y. Lee, Young-Tae Chang and Alan J. Davidson. The Vital Dye CDr10b Labels the Zebrafish Mid-Intestine and Lumen. *Molecules* 2017; 22: 454-464.
4. Lee, J.S.; Kim, Y.K.; Vendrell, M.; Chang, Y.-T. Diversity-oriented fluorescence library approach for the discovery of sensors and probes. *Mol. BioSyst.* 2009, 5, 411–421.
5. Abhishek D. Garg, Muthiah Bose, Mohammed I. Ahmed, William A. Bonass and Simon R. Wood. In Vitro Studies on Erythrosine-Based Photodynamic Therapy of Malignant and Pre-Malignant Oral Epithelial Cells. *PLoS* 2012; 7(4): e 34475.
6. Mahdi Z, Habiboallah G, Mahbobeh NN, Mina ZJ, Majid Z, Nooshin A. Lethal effect of blue light-activated hydrogen peroxide, curcumin and erythrosine as potential oral photosensitizers on the viability of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Laser Ther.* 2015 Mar 31; 24(2):103-11.
7. Field, H.A. Kelley A, L, Martell, A. M, Goldstein & Serluca, F. C. Analysis of gastrointestinal physiology using a novel intestinal transit assay in zebrafish. *Neurogastroenterol Motil.* 2009. 21; 304–312.
8. Palmér T, Ek F, Enqvist O, Olsson R, Åström K, Petersson P. Action sequencing in the spontaneous swimming behavior of zebrafish larvae - implications for drug development. *Sci Rep.* 2017 Jun 9; 7(1):3191.
9. M. Costanzo, B. Cisterna, A. Vella, T. Cestari, V. Covi, G. Tabaracci, and M. Malatesta. Low Ozone Concentrations Stimulate Cytoskeletal Organization, Mitochondrial Activity and Nuclear Transcription. *Eur J Histochem.* 2015; 59(2):129-136.
10. Sander V, Patke S, Lee JY, Chang YT, Davidson AJ. Ozone therapy in shock induced endotoxemic. II. The effect of ozone therapy upon selected histochemical reactions in organs of rats in endotoxemic shock. *Inflammation.* 2007.30 (3-4):69-86.

Agradecimiento

A Vicente Álvarez por el diseño gráfico de protocolo de inmersión usado en la investigación. Así mismo al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. UCV (CDCH). Proyecto Grupal: PG-09-8653-2013.

Recibido: 10/07/17

Aceptado: 18/07/17