



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



**"INDICADORES DE DAÑO HEPÁTICO POR ÁCIDO OKADAICO EN LARVAS DE
PEZ CEBRA (*Danio rerio*)"**

PIERA ANDREA PEPE VARGAS

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE

ABRIL, 2012

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

TITULO DEL SEMINARIO DE TITULO

Por

PIERA ANDREA PEPE VARGAS

Profesora guía

DRA. ALEJANDRA LLANOS RIVERA

Profesora co- guía

DRA. JAVIERA DE LA PAZ MONTT

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE

ABRIL, 2022

Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Laboratorio de Toxicología Acuática,
Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesora Guía:

Dra. Alejandra Llanos Rivera
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

Profesora Co-guía:

Dra. Javiera De la Paz Montt
Departamento de Biología Celular
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Amparo Uribe Pérez
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Concepción, Concepción

Dr. Fernando Martínez Acuña
Departamento de Biología Celular
Universidad de Concepción

Coordinadora Seminario de Título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

*A Andrea, la estrella más brillante
del universo.*

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento comienza a mi familia, en especial a mi madre y a mi padre, a Andrea, la estrella mas brillante del cielo, y a Renzo, “el gran pez”, gracias a ambos por confiar en mi cuando dije que para lograr mis sueños debía alejarme del nido, por ustedes mi amor a la ciencia y al mar, agradezco al universo el permitirme tenerlos como padres. A mis hermanas y hermanos, Renzo, Franco, Alessandra, Giulia y Tamara, que día a día y a pesar de la distancia alegraron y acompañaron mis aventuras universitarias.

A mis amigas Victoria Alfaro y Jimena González, sin ustedes esta proeza llamada tesis no hubiese sido igual, gracias por sostenerme y levantarme cuando el camino como científica se veía tan difícil, a ustedes, a mi gran amigo Marcelo Muñoz y a Ipa les debo las risas analgésicas que durante años han sanado todos los dolores. A Rodrigo gracias por ser y estar, por escucharme atento cuando contaba una y otra vez mis experimentos, por los abrazos de paz y los cariños que reiniciaban las jornadas más difíciles.

Un especial agradecimiento a mi profesora guía la Dra. Alejandra Llanos, desde el inicio de mi carrera universitaria su manera de enseñar marcó mis horas en aula y entrar a su equipo de trabajo me ha permitido conocer y admirar más su labor como docente y científica; junto a ella agradezco con cariño a los profesores Dr. Fernando Cruzat, Dra. Allisson Astuya y Dr. Rodrigo Gonzales por siempre confiar en mi y enseñarme cariñosamente.

Al maravilloso equipo al que llegué a trabajar en el Laboratorio de Toxicología Acuática, a Nicolas Zambrano, a la Dra. Javiera De la Paz y en especial a Patricio Yañez, gracias por enseñarme con paciencia y hacerme disfrutar tanto la ciencia.

Agradezco a todas las mujeres que han amado y trabajado por la ciencia, a aquellas que en silencio y por puro amor al conocimiento avanzaron en este tan difícil y tantas veces para nosotras injusto camino, gracias a todas, este es mi primer paso para seguir el trabajo que ustedes comenzaron.

Finalmente, agradecer al Proyecto FONDEF IDeA ID20I10078 por financiar la presente tesis y al equipo del Laboratorio de Producción Primaria, Fitoplancton y Toxinas Marinas de la Universidad Católica del Norte liderado por el Dr. Gonzalo Álvarez, por su apoyo en el análisis de muestras de agua para la cuantificación de toxinas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 9 |
| RESUMEN | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| 1.- Floraciones algales nocivas | 11 |
| 2.- Biotoxinas lipofílicas | 11 |
| 3.- Métodos de detección oficiales de biotoxinas | 13 |
| 4.- Pez cebra como modelo biológico | 14 |
| 5.- Ácido okadaico y hepatotoxicidad | 17 |
| 6.- Tinciones para la evaluación de daño hepático | 18 |
| 7.- Interacción del AO con el plástico: una problemática en el uso de la toxina en el laboratorio | 19 |
| 8.- Problemática de la investigación | 19 |
| HIPÓTESIS | 21 |
| OBJETIVOS | 21 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 1.- Mantenimiento de peces cebra y obtención de larvas | 22 |
| 2.- Estandarización de tinciones | 22 |
| 3.- Control positivo: etanol | 23 |
| 4.- Recubrimiento de placas con BSA para evitar pérdida de toxina por adsorción en plástico | 23 |
| 5.- Indicadores de hepatotoxicidad | 24 |

| | | |
|-----|---|----|
| 6.- | Procesamiento de imágenes | 29 |
| 7.- | Análisis estadístico | 29 |
| | RESULTADOS | 30 |
| 1.- | Control positivo: etanol | 30 |
| 2.- | Recubrimiento de placas con bsa contra la pérdida de toxina por adsorción de plástico | 31 |
| 3.- | Indicadores de hepatotoxicidad | 32 |
| 4.- | Evaluación de hepatotoxicidad causada por AO en larvas de pez cebra. | 35 |
| | DISCUSIÓN | 41 |
| | CONCLUSIONES | 47 |
| | LITERATURA CITADA | 48 |
| | Anexo 1: Protocolo de tinción Sudan Black B + Aceite Red-O | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Figura N°1.- Análisis de imagen para tamaño de gránulos. | 24 |
| Figura N°2.- Pruebas de densidad de gránulos de lípidos. | 25 |
| Figura N°3.- Ensayo en placa de 24 pocillos. | 27 |
| Figura N°4.- Larvas expuestas a EtOH en distintas concentraciones por 24 h. | 28 |
| Figura N°5.- Cuantificación de AO en placas con tratamiento BSA (CT) y sin tratamiento (ST). | 30 |
| Figura N°6.- Variación del tamaño del hígado. | 31 |
| Figura N°7.- Aumento de tamaño de gránulos de lípidicos frente a EtOH. | 32 |
| Figura N°8.- Pruebas de densidad de gránulos. | 33 |
| Figura N°9.- Relación entre el tamaño del hígado y la longitud de la larva. | 34 |
| Figura N°10.- Tamaño promedio de gránulos en concentración más alta de AO (250 ng/mL) y controles: solvente, negativo, positivo y recubrimiento de placa. | 35 |
| Figura N°11.- Tamaño promedio de gránulos en concentración más alta de AO (125 ng/mL) y controles: solvente, negativo, positivo y recubrimiento de placa. | 36 |
| Figura N°12.- Conteo de neutrófilos para distintos tratamientos | 38 |
| Figura N°13.- Hígado de larva de pez cebra | 44 |

RESUMEN

Entre las toxinas que se han descrito en Chile en los episodios de Floraciones Algaes Nocivas (FAN) se encuentran las Biotoxinas lipofílicas con el Ácido Okadaico (AO) como su principal representante. Los dinoflagelados que producen estas toxinas pueden ser consumidos por múltiples animales en el océano y estos pueden llevarlas al humano, de esta forma, los cuadros de intoxicación por consumo de mariscos con toxinas se convierten en un problema de salud pública. Dadas las desventajas que existe hoy respecto a las técnicas que se utilizan para la detección de estas toxinas en mariscos se ha dado el paso a que se presenten otras alternativas de ensayos. Presentamos un ensayo con embriones de pez cebra (*Danio rerio*), por el cual se buscó evaluar la hepatotoxicidad producida por AO a través de la exposición de la toxina en el medio a organismos de 5 dpf por 24 h a dos concentraciones 250 ng/mL y 125 ng/mL. Dentro de los criterios evaluados se destacó el tamaño de gránulos de lípidos como un buen indicador de daño hepático producido por AO logrando identificar evidencias de hepatotoxicidad cuantificables y estadísticamente significativas, lo que se suma a una gran cantidad de registros respecto a como esta toxina genera daños en este organismo en sus primeros estadios. Este estudio marca un precedente respecto a nuevas formas de medir daño hepático que en un futuro podrían implementarse como partes de una técnica de detección de AO complementaria a las técnicas oficiales actuales.

INTRODUCCIÓN

1. Floraciones Algales Nocivas

Las floraciones algales son eventos naturales que se desarrollan con frecuencia en el océano y que corresponden a un aumento en la proliferación de microalgas en la columna de agua por condiciones ambientales especiales. Cuando las microalgas que se reproducen en estos eventos son capaces de generar biotoxinas, los eventos pasan a ser llamados Floraciones Algales Nocivas (FAN o HAB por su sigla en inglés). Las biotoxinas marinas pueden causar la muerte masiva de peces, aves y mamíferos marinos, y además son capaces de producir cuadros agudos de intoxicación en humanos a través del consumo de mariscos contaminados, constituyendo así un riesgo a la salud pública, y causando graves pérdidas económicas a las operaciones de acuicultura, pesca y turismo; teniendo por lo tanto importantes repercusiones socio ambientales (Hallegraeff et al., 1995; James et al., 2010).

Varios autores han reportado en los últimos años un incremento mundial de los eventos de FANs que tendría relación con fuertes impulsores en el aumento de la temperatura siendo el principal de estos el cambio climático (Anderson et al., 2015; Kim, 2006; Trainer et al., 2020). A su vez, el aumento global y sostenido de la población humana y el aumento de ingresos per cápita tanto en las grandes potencias mundiales como en países en desarrollo, han generado un incremento en la demanda de proteína animal y, por ende, el incremento en la demanda de los productos del mar, como moluscos filtradores y salmónidos (FAO, 2020). Esto ha motivado el desarrollo de varios programas de control para proteger la salud pública y las actividades de acuicultura de los potenciales peligros que generan las FANs (Anderson et al., 2001)

2. Biotoxinas lipofílicas

Chile no está exento de eventos de FANs o, como son llamados comúnmente, mareas rojas; el desarrollo de estos eventos ha permitido que mediante programas de monitoreo, se

identifiquen a las microalgas que los generan, e incluso se caractericen las biotoxinas que estas producen. Respecto a esto último, Chile ha registrado presencia de tres grupos de biotoxinas:

1. Veneno Paralizante de los Mariscos (VPM).
2. Veneno Amnésico de los Mariscos (VAM).
3. Biotoxinas Marinas Lipofílicas (conocidas anteriormente como Veneno Diarreico de los Mariscos (VDM)).

Este último grupo destaca por ser conformado por compuestos poliéteres entre los que se encuentran el ácido okadaico (AO), una de las toxinas marinas más frecuentes, con una distribución mundial (Valdiglesias et al., 2013), y sus análogos, las dinofisistoxinas (DTXs); además de los azaspirácidos (AZA), las pectenotoxinas (PTX) y las yessotoxinas (YTX) (Sar et al., 2002). Estas toxinas al ser altamente lipofílicas se bioacumulan principalmente en las glándulas digestivas o hepatopáncreas de los organismos filtradores, causando intoxicaciones de diversa gravedad al ser consumidas por personas, o depredadores. Entre los dinoflagelados que producen este tipo de toxinas se cuentan varias especies del género *Dinophysis spp.* y *Prorocentrum spp.*, entre otras (Reguera et al., 2014)

El mecanismo de acción del AO y de las DTXs, se fundamenta principalmente en una potente acción inhibitoria sobre las proteínas-fosfatasa (PP1 y PP2A). Estas proteínas desempeñan papeles claves en la regulación del metabolismo. Por una parte, la PP1 regula el metabolismo del glucógeno, la contracción del músculo liso, participa en división celular y en la síntesis de proteínas, mientras que PP2A participa en procesos como la apoptosis, el crecimiento celular, la síntesis de proteínas y en el control de la mayoría de las principales vías metabólicas, como la glucólisis o el metabolismo de los lípidos (Hu et al., 2010).

El humano al consumir mariscos contaminados con dichas toxinas presenta un cuadro de intoxicación gastrointestinal cuyos síntomas principales son diarrea seguida de náuseas, vómitos y calambres abdominales, esto se debe a que al inhibir la PP1 y la PP2A se favorece la hiperfosforilación de las proteínas que controlan la secreción de sodio por parte de las células intestinales que regulan la permeabilidad de los solutos, lo que provoca la liberación de sodio y, por ende, la pérdida pasiva de líquidos responsable de los síntomas diarreicos. Estos

síntomas se pueden presentar de 30 minutos a pocas horas después de la ingestión de mariscos contaminados, y la recuperación completa ocurre dentro de 3 días. Estos síntomas a menudo se confunden con la intoxicación por enterotoxina bacteriana, debido a su similitud (James et al., 2010).

El potencial peligro que las toxinas como el AO y DTXs presentan a la salud humana ha motivado la implementación de programas de vigilancia para este tipo de toxinas por parte de las autoridades de salud en varios países, incluido Chile, lo que ha permitido a la sociedad científica la creación e implementación de novedosas y variadas técnicas de detección de biotoxinas que han contribuido al monitoreo y detección temprana de estas.

3. Métodos de detección oficiales de biotoxinas

Chile cuenta desde el año 1995 con el Programa Nacional de Vigilancia y Control de Fenómenos Algales Nocivos (Marea Roja), programa controlado por el Ministerio de Salud a través de los Laboratorios de las Secretarías Regionales Ministeriales (Seremis) de Salud y el Instituto de Salud Pública (ISP). En Chile, el método de detección para toxinas lipofílicas (AO, DTXs, PTXs, YTXs y AZA) en moluscos para consumo humano corresponde al bioensayo del ratón, técnica estandarizada y ampliamente utilizada en la detección de biotoxinas (Villarroel, 2004) En el ámbito internacional, la Unión Europea (UE) establece como cantidades máximas permitidas de biotoxinas lipofílicas (AO y DTXs y PTXs), tanto en el cuerpo entero del molusco vivo o en cualquier parte consumible del producto por separado, 160 µg AO eq/kg de carne de marisco (0,016 ng/mL). Para esclarecer si las muestras analizadas cumplen con los rangos autorizados de biotoxinas es necesario el uso de tecnologías analíticas altamente sensibles y costosas, como la cromatografía líquida de alto rendimiento asociada a espectrometría de masa (HPLC/MS/MS).

3.1 Bioensayo del ratón

Este ensayo validado internacionalmente consiste en una extracción de las toxinas presentes en el hepatopáncreas de los mariscos que se sospechen estén bioacumulando toxinas, por medio de solventes orgánicos como la acetona, luego de evaporar y llevar el extracto casi a sequedad

se resuspende en una solución acuosa y se inyecta en el peritoneo de tres ratones, los que se mantienen en observación durante 24 horas. La norma vigente en nuestro país indica que una muestra es tóxica si se mueren dos de tres ratones dentro de 24 horas de observación (Suarez-Isla & Guzman, 1999). En Chile este bioensayo es obligatorio como herramienta de certificación de alimentos para consumo nacional, por lo que es empleado masivamente en los laboratorios de los servicios de salud (Suarez-Isla & Guzman, 1999). A pesar de esta validación, el Panel de Contaminantes en la cadena alimentaria (Panel CONTAM), entidad europea que brinda asesoramiento respecto a los contaminantes en la cadena de alimentos, señala que este bioensayo presenta deficiencias y no lo considera una herramienta adecuada para fines de control debido a la alta variabilidad en los resultados y la limitada especificidad de la técnica (James et al., 2010). Además, existe un fuerte debate bioético respecto al uso de ratones en este tipo de ensayos, por ejemplo, en la UE se ha hecho el llamado a no realizar experimentos con animales si se dispone de otro método científicamente satisfactorio, razonable y factible para la obtención de resultados (Álvarez, 2010)

3.2 HPLC-MS/MS

El desarrollo y la implementación de técnicas de detección analítica como la cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) han sido cruciales para el desarrollo del conocimiento de la producción de biotoxinas, necesitándose cantidades mínimas de sustancia para esto. Así, el espectrómetro de masas tiene potencial para analizar todas las biotoxinas marinas identificadas en la actualidad y detectar análogos de las mismas, siempre que se posea cierta información previa sobre sus estructuras y pesos moleculares. La HPLC-MS/MS permite un grado muy alto de especificidad, ya que la detección de la sustancia se basa en el tiempo de retención cromatográfico, en el peso molecular de la sustancia y en la información estructural derivada de la presencia de fragmentos diagnósticos para cada analito. Dentro de sus limitaciones se encuentra el valor del equipamiento, ya que el costo de esta técnica es elevado y, por tanto, muchos laboratorios implicados en el monitoreo de biotoxinas e investigación no pueden permitirse su utilización (Suárez-Gomez, 2003). Además, para su funcionamiento se requiere personal altamente capacitado en el uso del instrumental y la interpretación de los resultados.

4. Pez cebra como modelo biológico

Considerando la necesidad de nuevas técnicas que sean sensibles, pero a la vez más accesibles, el uso de modelos biológicos alternativos como el pez cebra (*Danio rerio*), puede ser una buena alternativa. *Danio rerio* es un pez tropical de pequeño tamaño, ampliamente utilizado como modelo vertebrado de estudio en varias áreas del conocimiento (Fellenz et al., 2014).

Kimmel et al (1995) definieron las etapas del desarrollo embrionario y larval en el pez cebra en horas post fecundación (hpf), definiendo así una escala estándar de desarrollo a 28,5°C, lo que es posible debido a la alta sincronización con que ocurre la embriogénesis de esta especie a temperaturas constantes. Esta uniformidad en las condiciones de crecimiento del pez que han podido ser replicadas por varios grupos de científicos ha permitido generar información morfológica, bioquímica y fisiológica en todas las etapas del ciclo de vida del pez cebra, tanto en el desarrollo embrionario y larval, como en juveniles y adultos de ambos sexos de esta especie.

Una gran ventaja del modelo radica en su alta tasa de fecundidad, ya que es posible obtener aproximadamente 200 embriones por hembra cada semana (Fellenz et al., 2014). Además, al trabajar con este organismo de pequeño tamaño existe una economía en el mantenimiento, y a diferencia de las especies más grandes, como los ratones (aprox. 12-15 cm), el diminuto tamaño de las larvas (aprox. 3mm) y los peces cebra adultos (aprox. 5 cm) se minimizan los costos experimentales, esto ocurre por las bajas cantidades de soluciones de dosificación (productos químicos experimentales, medicamentos, contaminantes) que se requieren tanto para tratamiento y mantenimiento de peces vivos como para la realización de los experimentos (Hill et al., 2005)

Pero sin duda una de sus mayores ventajas es que tanto los embriones como el corion de este organismo son transparentes, y las larvas desarrollan su pigmentación gradualmente. Debido a esto, sólo es necesario un microscopio estándar para visualizar claramente, por ejemplo, el desarrollo de varias estructuras y órganos, como un hígado en crecimiento, o la frecuencia cardíaca. La organogénesis del pez cebra se inicia a las 24 hpf y a las 48 hpf ya se ha desarrollado una larva que eclosiona entre el segundo y tercer día post fecundación (dpf). A los 5 dpf se han establecido todos los sistemas de órganos principales, se agotan las reservas

nutricionales del vitelo, y las larvas están listas para alimentarse (Chu & Sadler, 2009). Esta facilidad para ver su desarrollo da paso a la creación de ensayos basados en criterios de valoración morfológicos de toxicidad, que son evaluables sin la necesidad de disección (He et al., 2013; Hill et al., 2012).

El pez cebra es altamente sensible a las biotoxinas, por lo que se ha utilizado como un modelo útil para comprender el daño causado por tales agentes y desarrollar pruebas biológicas en busca de prevenir y reducir el riesgo de intoxicación en casos potenciales de contaminación de alimentos (Vargas et al., 2015). Hill et al. (2005) indicaron que es probable que se maneje más información respecto a las reacciones ante diferentes sustancias en el pez cebra que sobre cualquier otra especie de pez. Para exponer al pez cebra, los químicos de prueba pueden disolverse en el medio y las larvas absorberán pequeñas moléculas diluidas en el agua circundante a través de la piel, el intestino o las branquias dependiendo de la edad (He et al., 2013).

Todo lo expuesto convierte al pez cebra en un candidato ideal para la investigación en toxicología y toxinología. Dentro de los ensayos con sustancias tóxicas que se han realizado con este organismo destacan trabajos que describen resultados en cardiotoxicidad, neurotoxicidad, actividad locomotora y hepatotoxicidad, entre otros (Berry et al., 2007; Cornet et al., 2017; Hill et al., 2005; Howarth et al., 2013; Mcgrath & Li, 2008; Park et al., 2020). Varias investigaciones han confirmado que frente a determinadas sustancias el pez cebra exhibe mecanismos equivalentes a los mecanismos en los mamíferos, incluida la inducción enzimática y el estrés oxidativo (Mcgrath & Li, 2008). A nivel inmunitario, al igual que otros teleosteos, también posee varias similitudes con los mamíferos, entre estas semejanzas está el que poseen una gran variedad de granulocitos y un linaje separado de macrófagos, siendo el neutrófilo el granulocito más abundante en el pez cebra (Arteaga et al., 2020).

Finalmente, varios estudios establecen que el AO ejerce efectos negativos sobre el pez cebra a través de la exposición diluida de la toxina. Se han registrado efectos relacionados con la inhibición en el desarrollo en embriones, además de respuestas como nado deficiente, falta de flotabilidad y ataxia en organismos adultos. También, se han hecho estudios para examinar el daño oxidativo que provoca el AO sobre embriones de este organismo (Barrio et al., 2015;

Figuroa et al., 2020; Xiong et al., 2019). Estudios con DTXs, biotoxinas análogas al AO, han reportado retraso en la absorción del saco vitelino por parte de larvas de este animal (Yañez, 2019).

5. Ácido okadaico y hepatotoxicidad

Soud et al. (2018) probaron en dorada (*Sparus aurata*) que el AO tiene una toxicidad extensa y puede dañar múltiples órganos y sistemas, reafirmando que no existe un órgano específico en el que actúe la toxina posterior al ingreso al cuerpo. Aún así existe evidencia de que la exposición al AO provoca varios daños en el hígado, destacando una posible reorganización de la arquitectura del citoesqueleto, la pérdida de la comunicación intercelular y la apoptosis en los hepatocitos, lo que sugiere que el hígado puede ser uno de los principales órganos afectados por esta toxina (Fu et al., 2019)

Estudios celulares han indicado que el mecanismo principal de la hepatotoxicidad generada por AO es la destrucción del citoesqueleto hepático y el desencadenamiento de la apoptosis al alterar el estado de fosforilación de las proteínas asociadas al citoesqueleto (Rubiolo et al., 2012).

Para la evaluación de hepatotoxicidad varios los criterios que se han utilizado para evaluar daño hepático en peces cebrá, con diferentes complejidades y resultados, en este trabajo evaluamos uno que aprovecha la transparencia de las larvas y que se basa en evaluaciones morfológicas: la evaluación de esteatosis o hígado graso.

5.1 Esteatosis e inflamación del hígado

El pez cebrá completa la morfogénesis primaria del hígado a las 48 hpf y este órgano está completamente formado y funcionando a las 72 hpf. Con la excepción de diferencias menores, la anatomía general, la organización, la composición celular y la función de un hígado de pez cebrá sano es prácticamente la misma que en los mamíferos (He et al., 2013). La acumulación excesiva de triglicéridos en los hepatocitos, las células del hígado, es el sello distintivo de la esteatosis (Schneider et al., 2017) y esta puede o no estar acompañada por un incremento en las dimensiones del órgano, que es un criterio ampliamente utilizado para medir deterioro en la función hepática en varios modelos de animales, incluido el pez cebrá. En general, para el pez cebrá se ha estimado el aumento o disminución del tamaño del hígado a través de la

medición del área de este órgano en base a fotografías tomadas desde una vista lateral (Cornet et al., 2017; Howarth et al., 2013; Park et al., 2020). El Etanol (EtOH) es un compuesto químico orgánico que, según la literatura (Cornet et al., 2017; Howarth et al., 2011), induce cuadros de hígado graso en larvas de pez cebra en una concentración del 2%; por lo que se puede considerar como un control positivo de daño hepático.

La esteatosis en mamíferos conlleva una inflamación y daño en las células del hígado, la inflamación es la respuesta rápida del sistema inmune de los organismos para hacer frente a las amenazas externas como microorganismos, parásitos, protozoos y sustancias extrañas que pueden ingresar a un organismo. El sistema inmune es el encargado de mantener la integridad biológica del organismo, de forma que, si hay trasgresiones de las barreras de defensa, se activa primeramente su fracción innata. Esta activación inicial se manifiesta en primer lugar con el movimiento de leucocitos al tejido lesionado, siendo los neutrófilos las primeras células en migrar al sitio de daño, generando una inflamación localizada (Summers et al., 2010). Una vez que los leucocitos llegan al sitio de la lesión, se disparan una serie de procesos que incluyen la producción de diversas moléculas por parte del tejido y de los leucocitos, las que actúan como señales moleculares necesarias para el proceso de inflamación (Ahmed, 2011).

Los neutrófilos son un tipo de leucocitos polimorfonucleares y son los primeros linfocitos que llegan a las áreas de inflamación. La búsqueda y cuantificación de neutrófilos en tejidos ha sido utilizada ampliamente como un indicador de inflamación en peces cebra, para este fin se han empleado diferentes herramientas como la visualización histológica por medio de pruebas citoquímicas, como el uso de tinciones. También existen registros del uso de PCR cuantitativa y la cuantificación de compuestos proinflamatorios por análisis químico. Herramientas de mayor complejidad como el uso de líneas transgénicas también han sido altamente consideradas para este fin especialmente con el uso líneas que expresan marcadores moleculares fluorescentes en los que es posible ver el comportamiento in vivo de neutrófilos durante el proceso inflamatorio (Hernández, 2019).

6. Tinciones para la evaluación de daño hepático

Como se mencionó anteriormente las pruebas citoquímicas como las tinciones son utilizadas para evaluar, por ejemplo, la presencia de neutrófilos que podrían indicar inflamación en algún

tejido. En esta investigación evaluamos la presencia de neutrófilos con la tinción Sudan Black B, que corresponde a un colorante que posee una gran afinidad por los fosfolípidos y esteroides, es insoluble en agua y puede teñir de color marrón oscuro o negro el citoplasma, los lípidos neutros, los fosfolípidos y el colesterol (Wang et al., 2015). La tinción de los abundantes gránulos presentes en los neutrófilos es más evidente que en otras células (Quan et al., 2019) por lo que esta tinción se considera una buena herramienta para evaluar si existe una reacción inflamatoria a través de la detección de la presencia de neutrófilos.

Por otro lado, también se utilizó la tinción de lípidos con aceite red-O (RO) correspondiente a un colorante diazo hidrófobo soluble en grasa que tiñe grasas neutras, ácidos grasos y triglicéridos de un color rojo-anaranjado. Es de uso común para visualizar lípidos en secciones histológicas y ha sido utilizado para este fin en larvas fijadas de pez cebra (Cornet et al., 2017; Ramírez-Zacarías et al., 1992; Yoganantharjah et al., 2017).

7. Interacción del AO con el plástico: Una problemática en el uso de la toxina en el laboratorio.

Debido a la baja solubilidad en agua de las biotoxinas lipofílicas, como el AO, un grupo de investigadores decidió estudiar su absorción en superficies plásticas, que abundan como contaminantes en los océanos. Así, Costa et al. (2020) presentaron resultados respecto a cómo distintos tipos de materiales plásticos son capaces de retener a esta toxina disuelta en sistemas acuáticos y que también, en una última instancia, podrían estar disponibles para otros organismos marinos. Dentro de los plásticos que probaron y que encontraron que adsorben AO al estar en contacto con este, se encuentra el poliestireno (PS), material del que están hechos varios materiales plásticos de laboratorio como placas petri y las placas multipocillos que son frecuentemente utilizadas para ensayos de exposición a toxinas, por lo que se debe considerar a la hora de trabajar con AO la disminución de su concentración, a causa de la absorción por parte del material plástico.

8. Problemática de la investigación

Considerando todo lo anterior es clara la necesidad de desarrollar y disponer de un método complementario, basado en la cuantificación de un efecto directo de acción relativamente simple, rápido y económico para la detección de toxinas lipofílicas, y especialmente para AO que es la más abundante y frecuente de este grupo. Se requiere que además el método sea efectivo, de alta especificidad y que cumpla con las normativas y requerimientos bioéticos actuales. Esta tesis plantea que un estudio de hepatotoxicidad en larvas de pez cebra, específicamente por la generación de esteatosis, resultaría ser un buen candidato para el desarrollo de un bioensayo de detección de AO, y potencialmente de otras toxinas hepatotóxicas.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

El ácido okadaico produce hepatotoxicidad en larvas de *Danio rerio* (pez cebra) expuestas por inmersión a esta toxina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar hepatotoxicidad en larvas de *Danio rerio* expuestas a ácido okadaico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir indicadores para la evaluación de daño hepático en larvas de *Danio. rerio* con un compuesto hepatotóxico conocido.
2. Cuantificar la respuesta hepatotóxica de las larvas de *Danio rerio* incubadas con ácido okadaico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Mantención de peces cebra y obtención de larvas

Los peces cebra adulto de cepa AB se mantuvieron en acuarios a 27 °C aproximadamente, bajo un ciclo de 14:10 de luz/oscuridad. Las larvas de pez cebra se obtuvieron al introducir cajas con doble fondo en los tanques de peces adultos. Estos peces adultos fueron seleccionados cuidando que no hubiesen sido sometidos a estrés ni hayan desovado en la última semana; para así cuidar la calidad y tamaño del desove, así como la salud de los reproductores. Las ovas obtenidas se observaron bajo lupa y se desecharon todos los ovocitos no fertilizados, anormales o coagulados. Una vez obtenidos los embriones viables se mantuvieron las primeras 24 h en medio E3 (NaCl 5mM; KCl 0,17mM; CaCl₂ 0,33mM; MgSO₄ 0,33mM) con azul de metileno para evitar contaminación fúngica.

Las ovas se mantuvieron en placas petri para permitir su desarrollo sincrónico, dentro de una incubadora con fotoperiodo (VELP) a 28°C, hasta que llegaron al estadio larval de 5 dpf. Diariamente se realizó limpieza a las placas eliminando cualquier impureza que apareciera en el medio, además de aquellos huevos o embriones que murieron o presentaron malformaciones (edemas, curvaturas en la notocorda, etc).

2. Estandarización de tinciones

Fue necesario estandarizar los protocolos de tinción de permitieron la visualización de gotas de lípidos en el hígado. Esto se realizó utilizando larvas de 5 dpf fijadas en paraformaldehído (PFA) 4% durante toda la noche.

Para la tinción de neutrófilos se utilizó Sudan Black B (SBB), para su preparación se disolvieron 0,6 g de Sudan black B en 200 mL de etanol (EtOH) y se agitaron con calor hasta su completa disolución, posteriormente la solución se filtró con un filtro de 0,2 µm unido a una jeringa de 200 mL, la solución se mantuvo a 4°C y oscuridad.

Sobre la tinción de Sudan Black B se requirió aplicar una tinción con aceite red-O (RO) para comprobar la acumulación de lípidos, esta tinción fue probada en primer lugar en larvas de 3, 4 y 5 dpf fijadas en PFA 4%. Para la preparación del RO se disuelven 0,05 g en 10 mL de Propilenglicol 100% (PG) y se agita hasta su completa disolución. Luego de eso, se filtra la solución con una malla de 300 μm y se utiliza inmediatamente.

El protocolo de doble tinción utilizado finalmente en esta investigación se detalla en el Anexo 1.

3. Control positivo: Etanol

Para verificar la efectividad del etanol como control positivo (Cornet et al., 2017; Howarth et al., 2011) se expusieron larvas de 5dpf en placas de 24 pocillos a concentraciones de 1%, 1,5%, 1,7% y 2% de EtOH en medio E3. Tras 24 horas de exposición se cuantificó mortalidad y anomalías corporales como curvaturas en la notocorda o presencia de edemas. Las larvas que presentaron estas anomalías fueron descartadas y el resto fueron teñidas con RO para comprobar esteatosis por medio de la visualización de lípidos teñidos en el hígado.

4. Recubrimiento de placas con BSA para evitar pérdida de toxina por adsorción en plástico

Se buscó disminuir la pérdida de AO por adsorción del poliestireno de las placas multipocillo y así obtener las concentraciones experimentales de toxina deseadas. Para esto se probó un recubrimiento de las placas multipocillos con albumina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS.

En primer lugar, se evaluó si existía alguna reacción de toxicidad por parte de las larvas al BSA, para esto se utilizaron placas de 24 pocillos y se cubrieron completamente con BSA al 1%, se mantuvieron toda la noche y al día siguiente se retiró este compuesto y se dispusieron larvas de 5dpf en medio E3 por 24 horas. Tras estas horas de exposición se cuantificó mortalidad y anomalías corporales como curvaturas en la notocorda o presencia de edemas, las larvas que presentaron estas anomalías fueron descartadas y el resto fueron teñidas con aceite red-O para comprobar presencia de hígado graso.

Al comprobar que las larvas sobrevivían al tratamiento se evaluó si este evitaba la pérdida de toxina por adsorción del material de la placa. Para esto se trabajó con placas de 96 pocillos, a cada pocillo se agregó 100 uL apróx. de BSA y mantuvo durante la noche anterior al tratamiento. Al día siguiente se retiró el BSA y se añadieron 100 µL de AO en concentraciones de: 0,012, 0,016 y 0,02 ug/mL diluidas con E3. Las mismas concentraciones se incubaron en pocillos sin tratamiento para realizar la comparación. Luego de 24 horas de incubación las muestras de toxina fueron retiradas de las placas, trasvasiadas a viales ámbar, y enviadas para análisis por HPLC en el Laboratorio de Producción Primaria, Fitoplancton y Toxinas Marinas del Departamento de Acuicultura de la Universidad Católica del Norte. Para evaluar si existía pérdida de toxina por adsorción se compararon los valores de concentración de AO entre muestras de igual concentración nominal provenientes de placas tratadas o no previamente con BSA.

5. Indicadores de hepatotoxicidad

5.1 Anomalías en el tamaño de hígado

Para evaluar si se produce un aumento en el tamaño del hígado de las larvas por daño hepático se hicieron pruebas con larvas de 5 dpf expuestas a medio E3 y a EtOH al 1,7% durante 24 horas de exposición. Tras esto se cuantificó mortalidad y anomalías corporales como curvaturas o presencia de edemas, las larvas que presentaron estas anomalías fueron descartadas y el resto fueron teñidas con Sudan Black B y Aceite red-O para comprobar presencia de esteatosis.

Para medir el área del hígado como se describe en la literatura se tomaron imágenes de campo brillante con ayuda de una cámara digital réflex (CANON, EOS Rebel T6) acoplada a una lupa (ZEISS, Stemi 508). Para cada larva se tomaron tres imágenes: una en vista dorsal donde se distingue el cuerpo completo de cabeza a cola con aumento 2,0x con un lente adicional de 1,6x, otra imagen en una vista lateral de la larva donde se aprecia la doble tinción en el hígado y una tercera imagen con la larva en posición ventral desde donde se ven ambos lóbulos del hígado (Fig 5. a, b, c, respectivamente). Las dos últimas imágenes se realizan con aumento 5,0x con un lente adicional de 1,6x. Para mejorar la manipulación de las larvas y poder moverlas según las posiciones requeridas para las fotografías estas se dispusieron en una capa

de metilcelulosa al 4% a la hora de ser fotografiadas y se manipularon con agujas de disección.

Desde las fotografías se midió el área del hígado y la longitud de la larva con estos datos se calculó la relación entre el tamaño del hígado y la longitud del organismo; siguiendo lo propuesto por He et al. (2013) para evaluación del tamaño de saco vitelino:

$$\text{Relación tamaño de hígado y longitud notocordal} = \frac{\text{Área hígado } [\mu\text{m}^2]}{\text{Longitud notocordal } [\mu\text{m}]}$$

5.2 Tamaño de gránulos de lípidos en el hígado del pez cebra

Otra aproximación evaluada para evidenciar el daño hepático fue contabilizar el tamaño de los gránulos de lípidos contenidos en el hígado de las larvas, a través de la medida del área de estos. Para esto se diseccionaron los hígados de larvas de 5 dpf que fueron expuestas por 24 horas tanto a medio E3 como a EtOH al 1,7% y posteriormente teñidas con Sudan Black B y Aceite red-O (SBB+OR, Anexo 1).

Este procedimiento se hizo bajo lupa y con ayuda de agujas de disección elaboradas con alfileres entomológicos y pinzas. Una vez obtenidos los hígados, se procedió al montaje de grupos de no más de 10 en un portaobjeto, inmersos en glicerol 80%, y tras cubrirlos con un cubreobjeto se sellaron de tal forma que se mantuvieran en el tiempo.

Para el análisis de gránulos fue necesaria la obtención de imágenes, la que se realizaron con una cámara digital (BEL, Eureka 3.0 Plus) acoplada al microscopio. Con un aumento total de 400x se obtuvieron 3 fotografías por hígado con distintos planos de enfoque fino, para poder considerar los gránulos presentes en la profundidad de todo el tejido.

El procesamiento de imágenes se realizó con el software gratuito ImageJ; con la herramienta “óvalo” se seleccionaron por cada imagen entre 10 y 15 gránulos teñidos y bien definidos (sin borde difuso) y se midió su área (Fig. 1).

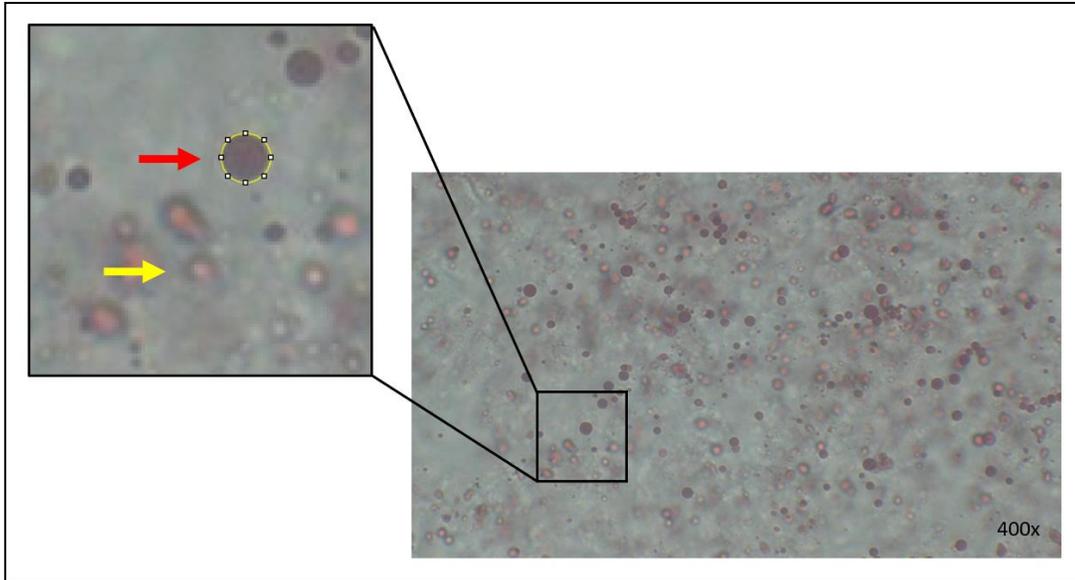


Figura N°1.- Análisis de imagen para tamaño de gránulos. A la izquierda, gránulos lipídicos con doble tinción SBB-RO, en el acercamiento se muestra con una flecha roja un gránulo de lípidos con borde definidos seleccionado con la herramienta ovalo del software, y con flecha amarilla un gránulo fuera de foco, que no se consideró para las medidas de este experimento.

5.3. Densidad de gránulos de lípidos

Otra prueba que se realizó fue la cuantificación del área que ocupaban los gránulos teñidos en una sección definida del hígado. Para esto se siguió el mismo procedimiento de disección y toma de fotografías explicado en el punto anterior y con el software Image J se transformaron las imágenes en imágenes de 8 bits y se binarizaron de forma que al seleccionar un área definida el programa pudiese calcular el porcentaje de la superficie que estaba ocupado con negro (gránulos) o blanco (vacío) (Fig. 2).

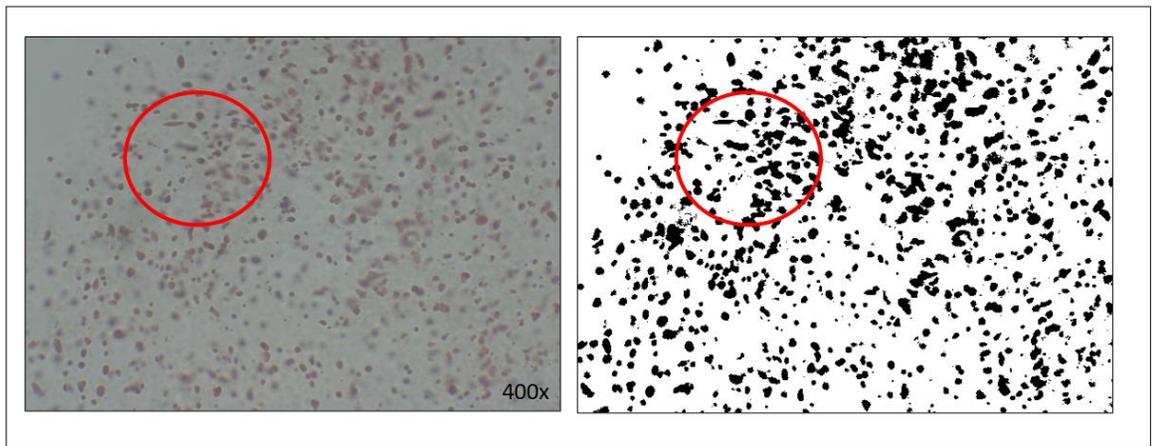


Figura N°2.- Pruebas de densidad de gránulos de lípidos. A la izquierda, fotografía de gránulos de lípidos en el hígado sin tratamiento de imagen, a su lado, la misma imagen binarizada con ImageJ. El área del círculo marcado de rojo representa un área aleatoria de la imagen en la que se calcularía el porcentaje de espacio negro o blanco.

5.4. Conteo de neutrófilos

El conteo de neutrófilos se realizó sobre hígados diseccionados y sin necesidad de tomar fotografías, se realizó un conteo total, es decir, se consideró la totalidad del hígado en la medida. Para visualizar los neutrófilos teñidos con SBB se utilizó un microscopio con objetivos de aumento 10x y 40x (BEL, BIO2T).

5.5 Evaluación de hepatotoxicidad por AO

La solución stock pura de AO fue adquirida en el National Research Council Canada (CRM-AO-d), las ampollas adquiridas contienen AO 8,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ suspendido en Metanol (MeOH).

Para cuantificar la respuesta hepatotóxica de las larvas de pez cebra ante el AO se expusieron durante 24 horas en placas de 24 pocillos, 36 larvas de 5 dpf para cada una de las concentraciones de la toxina con las que se trabajó en esta investigación: 250 ng/mL y 125

ng/mL. Los pocillos que contenían AO fueron tratados la noche anterior con recubrimiento de BSA como se describe en el punto 4 de esta metodología.

Las larvas fueron repartidas en tres pocillos con 12 individuos cada uno para cada tratamiento, en un volumen de 1800 μ L por pocillo, la densidad de larvas por pocillo, el número de réplicas y el volumen de los pocillos se replicó para cada uno de los tratamientos de esta experiencia.

Se ha reportado que el MeOH, solvente en el que viene suspendido el AO, genera efectos negativos en las larvas de pez cebrá de hasta 7 dpf en bajas concentraciones (2,5%; Maes et al. 2012). A partir de este antecedente y para evitar la interferencia del solvente se evaporó el MeOH de una ampolla de AO con un concentrador de nitrógeno que permite la aireación de nitrógeno constante a 50°C, hasta sequedad, para posteriormente resuspender la toxina en dimetilsulfóxido (DMSO) al 2% (Merck). Las concentraciones finales de DMSO en las distintas soluciones de AO fueron de 0,06% y 0,04%, concentraciones que fueron utilizadas para montar las réplicas de control de solvente para cada tratamiento.

Como control positivo de esteatosis se utilizó Etanol 1,7%. Por otra parte, larvas en medio E3 fueron utilizadas como control negativo (C-). Se consideró además un control de BSA, correspondiente a placas cubiertas previamente con este tratamiento. La distribución y definición de cada tratamiento utilizado se describe en la figura 3.

Una vez completadas las 24 h de exposición las placas fueron revisadas para cuantificar mortalidad y anomalías corporales tales como curvatura o presencia de edemas. Las larvas fueron fijadas en PFA 4% durante toda la noche, para luego teñirlas con una doble tinción SBB+OR según el Anexo 1.

Las larvas fueron fotografiadas desde una vista lateral para medir longitud de estas y desde el plano dorsal para medir el área del hígado. Posterior a esto se extrajeron los hígados de todos los individuos tratados para cálculo de las áreas de los gránulos y conteo de neutrófilos como se indican en los puntos 5.2 y 5.4 respectivamente. Las muestras se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su registro fotográfico.

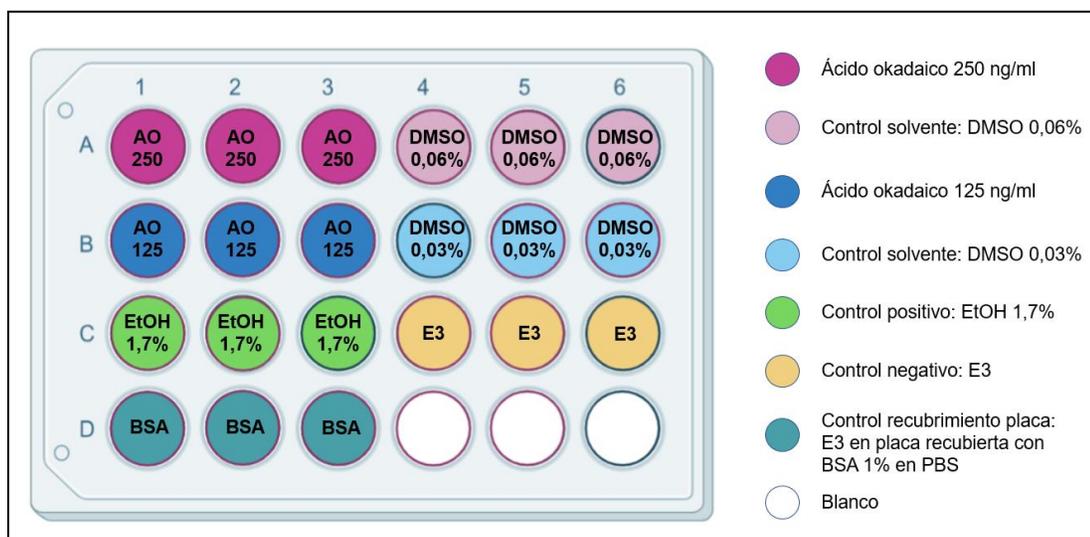


Figura N°3.- Ensayo en placa de 24 pocillos. Para cada pocillo se mantuvieron 12 larvas de 5 dpf con 1800 μ L de solución de cada tratamiento por 24 hrs. En la imagen se observa el orden en que se dispuso cada tratamiento en la placa multipocillo.

6. Procesamiento de imágenes

Para el procesamiento de imágenes en todos los experimentos que lo requerían se utilizó el software gratuito Image J con la extensión de “Análisis ciego”. Con este procedimiento se evitan posibles sesgos en la medida de imágenes y se promueve el rigor científico ya que la herramienta presenta de forma aleatoria las imágenes ocultando el tratamiento al que pertenecía.

7. Análisis estadístico

A cada set de datos registrados en los experimentos descritos, se aplicaron test de normalidad (pruebas de Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov), para determinar el tipo de estadística a utilizar. Considerando la distribución de los datos obtenidos en todos los experimentos, se compararon las medidas entre tratamientos de cada caso, siguiendo estadística paramétrica por medio de un test ANOVA o no paramétrica utilizando la prueba de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney

Para todos los análisis se utilizó el software GraphPad Prism, LLC (versión 9.2.0)

RESULTADOS

1. Control positivo: Etanol

En larvas expuestas a EtOH con concentraciones bajo el 2% no se observaron edemas o mortalidad en las 24 hrs que duró el experimento. En las larvas expuestas a EtOH 2% se observó curvatura (Fig. 4a) en un 80% de los individuos analizados y más de la mitad de los individuos presentaron edemas pericárdicos y oculares (Fig. 4b, c), estos ejemplares con malformaciones se descartaron para los análisis de hepatotoxicidad.

Para evaluar la hepatotoxicidad del EtOH a través de la esteatosis, se observaron bajo lupa las larvas teñidas con RO de todas las concentraciones y sólo las larvas expuestas a EtOH 1,7% mostraron una intensidad de tinción visiblemente mayor en el sector del hígado comparado con el control de medio E3 (Fig. 4d-f).

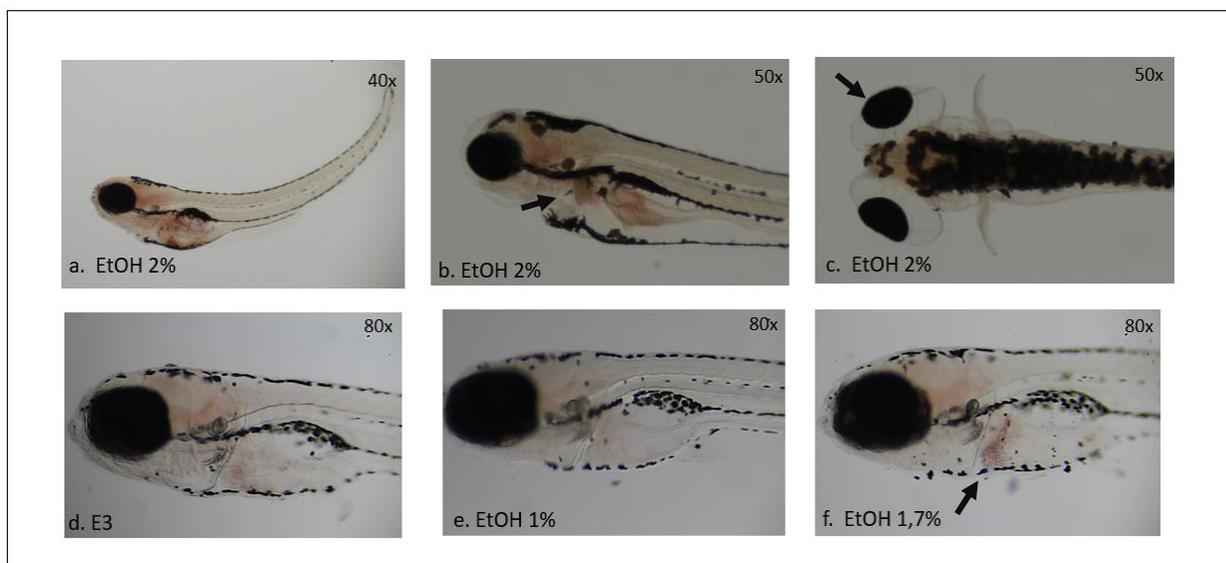


Figura N°4.- Larvas expuestas a EtOH en distintas concentraciones por 24 h. Las larvas expuestas a EtOH en concentración 2% presentan curvatura notocordal (a) y edemas pericárdicos (b) y oculares (c) (marcados con una flecha). De las concentraciones menores probadas sólo el EtOH al 1,7% mostró resultados

visibles a la tinción OR que buscaba resaltar lípidos en el sector del hígado (f) (marcado con flecha).

2. Recubrimiento de placas con BSA contra la pérdida de toxina por adsorción de plástico

El tratamiento de recubrimiento de placas con BSA no indujo mortalidad larval ni malformaciones para las larvas incubadas por 24 h en este tratamiento.

Respecto a la efectividad del tratamiento para evitar la pérdida de toxina por adsorción del material de las placas, la cuantificación de AO demostró que efectivamente el tratamiento de recubrimiento de placas con BSA disminuye la adsorción de la toxina al compararlo con la pérdida que tienen las placas que no son tratadas. Sin embargo, todas las concentraciones estimadas corresponden a cerca del 60% de la concentración nominal agregada, por lo que a pesar del recubrimiento de BSA existiría una pérdida de toxina que asociamos a la adsorción del plástico de hasta el 40% de la concentración nominal. Por tal razón al definir las concentraciones de AO del experimento final se agregó un porcentaje extra del 40% de la toxina deseada para compensar esta pérdida.

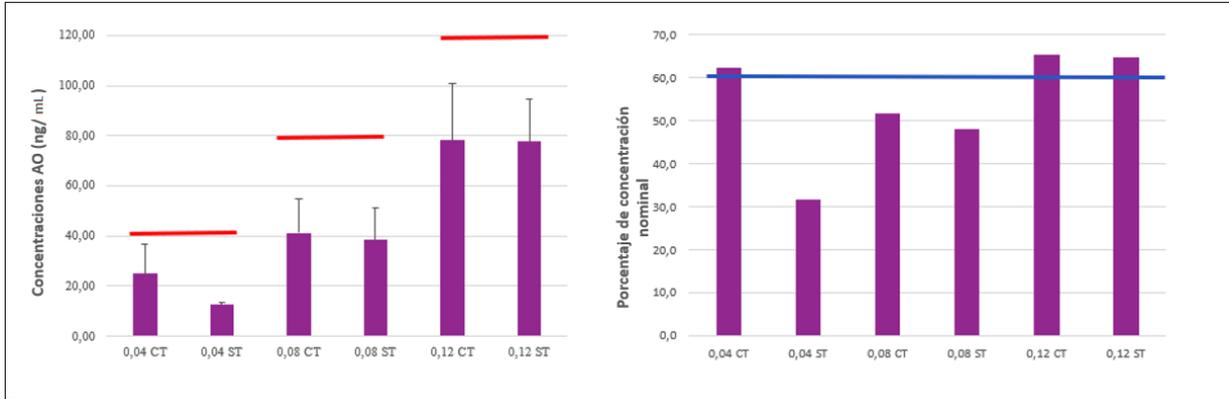


Figura N°5.- Cuantificación de AO en placas con tratamiento BSA (CT) y sin tratamiento (ST). A la izquierda, promedio para cada concentración con y sin tratamiento de BSA, las líneas rojas indican la concentración nominal de la toxina agregada en cada caso. A la derecha, cuantificación de AO se presenta en función del porcentaje de la concentración nominal que arrojó cada medida, la línea azul marca el 60%, valor que se consideró como el máximo porcentaje de protección ante la pérdida de toxina que entregó el tratamiento, por el cual las concentraciones de AO a utilizar en esta tesis se recalcularon agregando un 40% de toxina para compensar una posible pérdida. Los valores corresponden a concentraciones expresadas en ng/mL.

3. Indicadores de hepatotoxicidad

3.1 Anomalías en el tamaño del hígado

Las diferencias de tamaños del hígado de las larvas expuestas a E3 y EtOH 1,7% desde imágenes captadas en posición lateral o ventral (Figura 5a, b y c); sólo fueron significativas en larvas fotografiadas en vista ventral ($p = 0,0114$; Fig. 5b, d). Por tal razón para los experimentos posteriores se definió esta orientación para cuantificar tamaño de hígado (Fig. 5, c, e), que resultó ser significativamente mayor en las larvas expuestas al control positivo EtOH 1,7%.

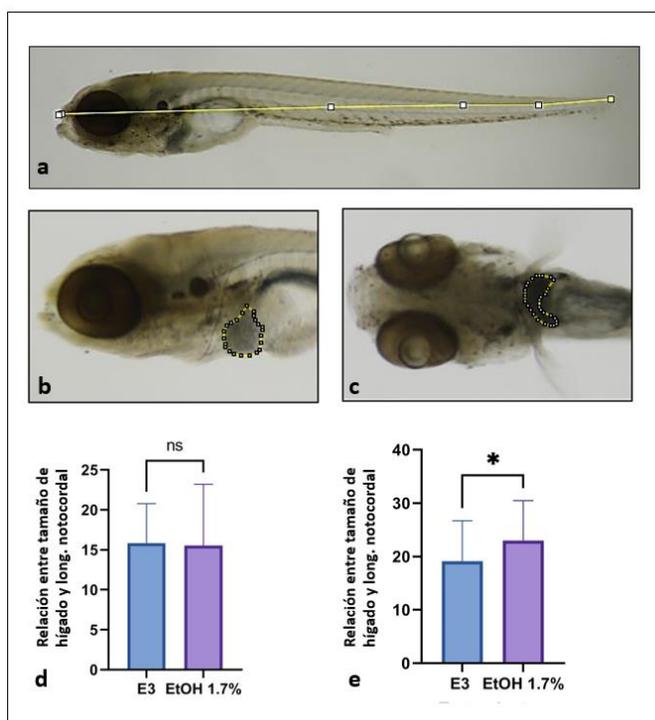


Figura N°6.- Variación del tamaño del hígado. Diferencia entre resultados obtenidos desde larvas 5dpf expuestas a 24 h a tratamientos con medio E3 y EtOH 1,7%, analizados desde fotografías tomadas en vista ventral (b) y lateral (c). Al graficar los datos se obtienen diferencias significativas (Test Mann-Whitney, $p = 0,0114$) entre los tamaños de hígados analizados en fotografías con vista ventral. Larvas teñidas con SBB.

3.2 Tamaño de gránulos de lípidos en el hígado del pez cebrá

El estudio del tamaño de los gránulos de lípidos en hígados de larvas de pez cebrá expuestos a EtOH 1,7% como control positivo y E3, como control negativo muestra que es posible distinguir diferencias significativas entre los tratamientos con este indicador (Fig. 6a, $p < 0,001$). En general se observa como los gránulos de lípidos provenientes de hígados de larvas tratadas con el control positivo son en promedio de mayor tamaño que los mismos provenientes de larvas expuesta al control negativo (Fig. 6 b, c, respectivamente).

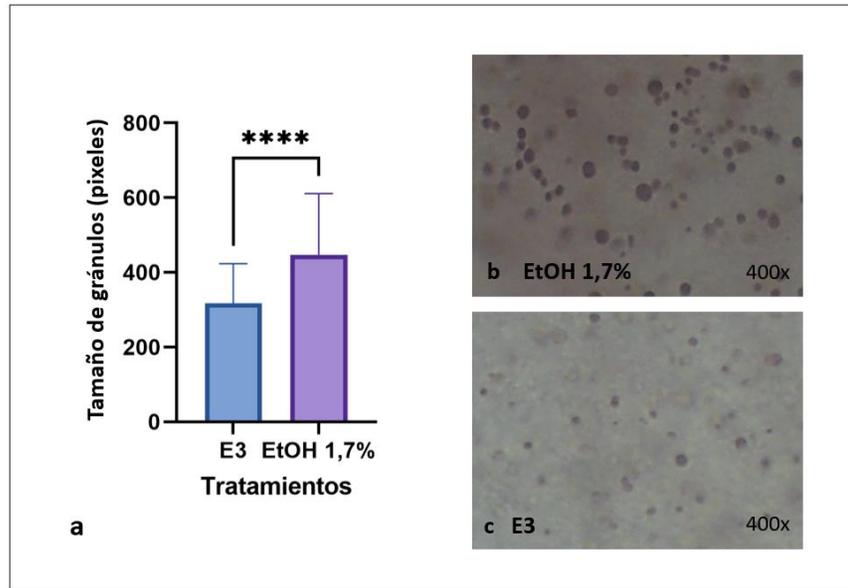


Figura N°7.- Aumento de tamaño de gránulos lipídicos frente a EtOH. Diferencia entre resultados obtenidos desde larvas de 5 dpf expuestas por 24 h a medio E3 y EtOH 1,7%. Se observan diferencias de los tamaños de gránulos entre tratamientos desde fotografías (b, c), la gráfica (a) muestra diferencias significativas ($p < 0,001$) entre valores promedio del área de los gránulos.

3.3 Densidad de gránulos de lípidos

En relación con este atributo no fue posible hacer un análisis de imágenes completo ya que la variada calidad de las imágenes obtenidas desde el microscopio resultó en una binarización de imágenes también con alta variabilidad. Lo anterior significó que en muchos casos el resultado del tratamiento de imágenes no se condecía con las superficies reales que estaban cubiertas por gránulos (Fig. 6). Por lo expuesto esta metodología fue descartada para la evaluación de hepatotoxicidad en pruebas con AO.

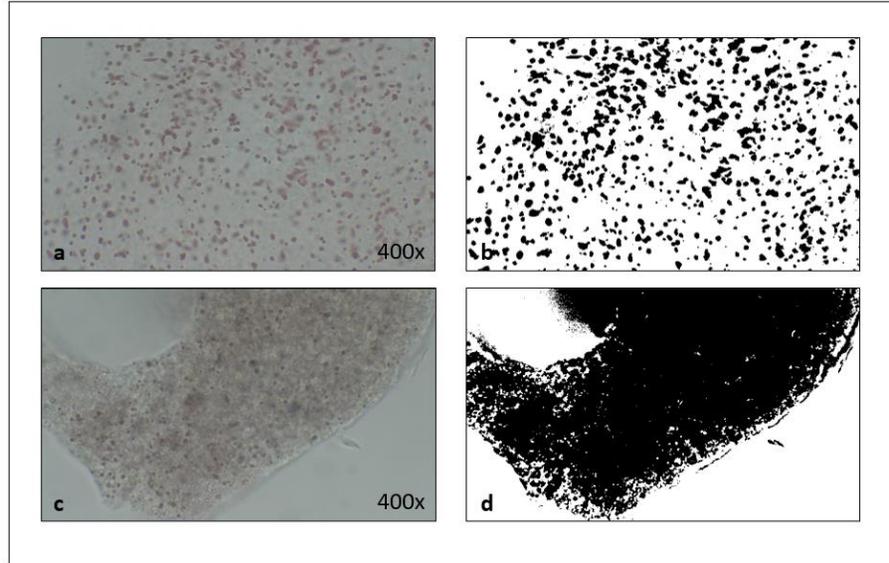


Figura N°8.- Pruebas de densidad de gránulos. En este ejemplo ambas imágenes (a, c) corresponden a hígados diseccionados vistos bajo microscopio al mismo aumento, pero la diferencia en la calidad de las imágenes y el balance de luz y sombra impiden obtener en varias fotografías una binarización de la fotografía que permita distinguir con facilidad los espacios ocupados con gránulos; como ocurre en la imagen (d).

4. Evaluación de hepatotoxicidad causada por AO en larvas de pez cebra.

4.1 Evaluación de hepatotoxicidad por tamaño de hígado

En general, las imágenes analizadas no permitieron definir con claridad el área de los hígados por lo difuso de sus márgenes y esto mermó la calidad de las medidas; lo que se confirma al observar que en el tratamiento de etanol no se observó el mayor tamaño de hígado cuantificado en la fase de estandarización. De tal forma, las mediciones del tamaño del hígado expresado como la relación entre el tamaño del hígado y la longitud larval no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos de AO respecto a los tratamientos control (Figura 7 $p > 0,05$). Esto indica que utilizando este parámetro no existiría evidencia de daño hepático inducido por el AO.

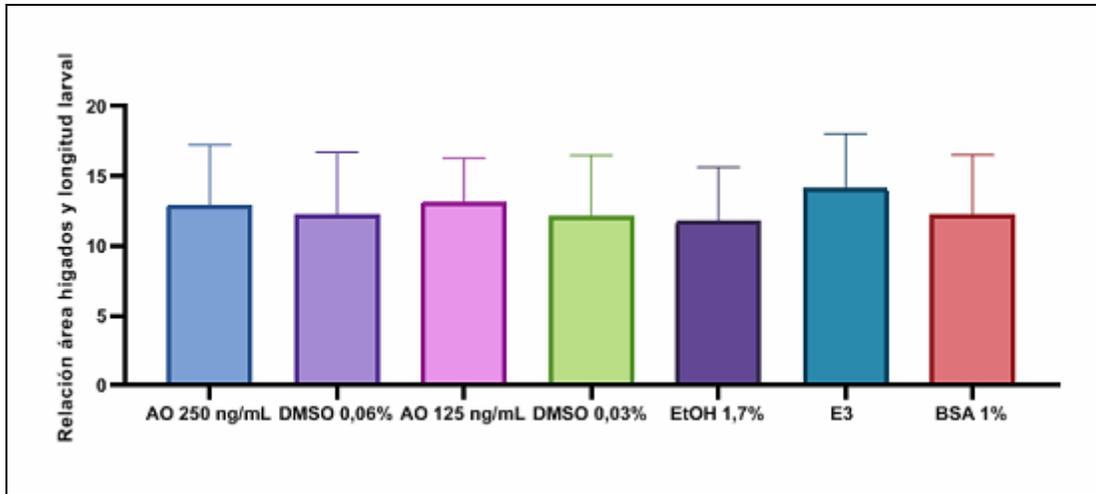


Figura N°9.- La relación entre el tamaño del hígado y la longitud de la larva tras ser expuestas a distintos tratamientos no presenta diferencias significativas (Test ANOVA, $p > 0,05$) entre estos.

4.2 Evaluación de hepatotoxicidad por tamaño de gránulos de lípidos

En primer lugar, para este ensayo sobresale en sus resultados que las comparaciones entre los controles positivo (EtOH 1,7%) y negativo (E3) se comportaron de manera opuesta respecto a los ensayos preliminares, presentando una diferencia entre ellos que muestra un promedio del tamaño de gránulos mayor en el tratamiento con E3.

De las concentraciones de AO probadas, sólo en larvas expuestas a la concentración de 250 ng/ml (AO1) se observan diferencias significativas en el área promedio de los gránulos de lípidos en comparación a larvas incubadas en la condición de control negativo (medio E3, $p < 0,0001$; Fig. 8). También se observa mayor tamaño de gránulos en los hígados del tratamiento de AO1 respecto a aquellos gránulos de lípidos en hígados de larvas tratadas con el control positivo EtOH 1,7%, indicando que incluso podría existir un daño mayor que el ocasionado por el control positivo.

El tamaño de los gránulos lipídicos de larvas incubadas con el control solvente (DMSO 0,06%) presenta diferencias significativas respecto al tratamiento de AO1 (con concentración

equivalente de DMSO), pero no en relación control negativo; evidenciando tamaños de gránulos menores a los del tratamiento con la toxina. Estos resultados indican que el solvente por sí sólo no induciría hepatotoxicidad, y que el efecto observado corresponde al efecto hepatotóxico de AO.

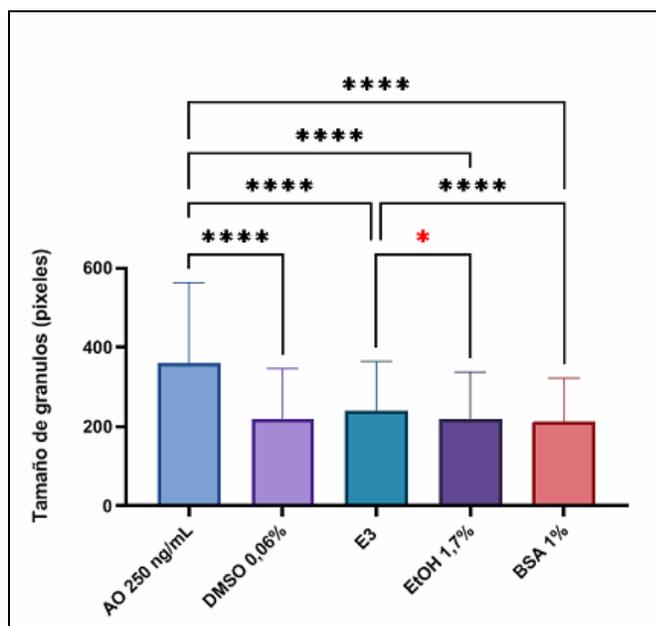


Figura N°10.- Tamaño promedio de gránulos en concentración más alta de AO (250 ng/mL) y controles: solvente, negativo, positivo y recubrimiento de placa. Se indica con **** diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$), el tratamiento de AO presenta diferencias significativas con todos los controles. Se destaca en rojo el resultado entre el control negativo y positivo que presenta una tendencia contraria a la misma en los experimentos preliminares. Todos los valores se muestran como promedio \pm desviación estándar.

Por otro lado, el tamaño de gránulos en larvas expuestas a la concentración más baja de ácido okadaico correspondiente a 125 ng/ml (AO2), no presenta diferencias significativas con el control negativo E3 (Fig. 9).

A diferencia de lo que ocurrió con la concentración más alta en el caso del control solvente para AO2 (DMSO 0,03%) este no presentó diferencias significativas ni con el tratamiento con toxina ni con el resto de los controles.

El tratamiento de recubrimiento de placa con BSA para evitar la pérdida de toxina presenta diferencias significativas con los dos tratamientos con AO a distintas concentraciones. Pero al presentarse un resultado anómalo respecto a la relación entre los controles positivo y negativo no es posible concluir si es que el BSA genera o no alguna interferencia en la cuantificación basándonos en la comparación de los resultados que arrojaron dichos tratamientos.

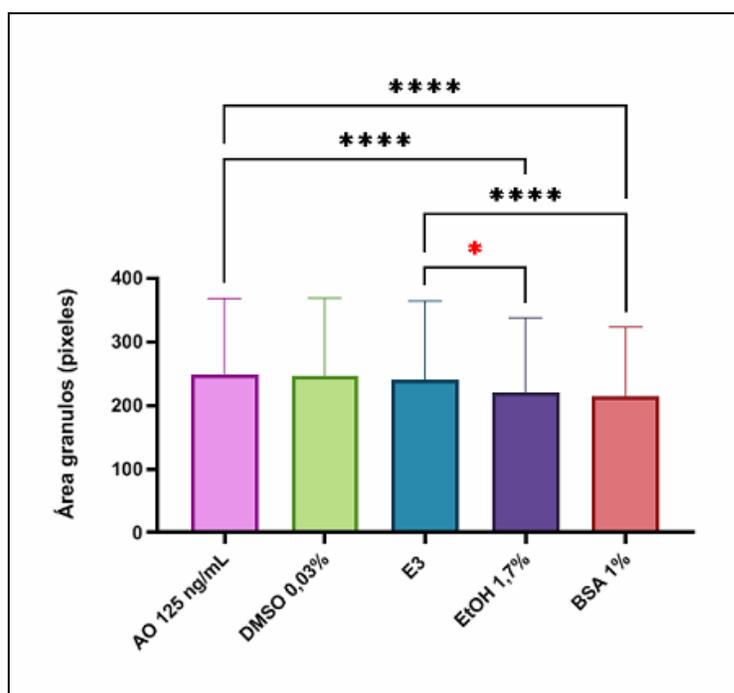


Figura N°11.-Tamaño promedio de gránulos en concentración más baja de AO (125 ng/mL) y controles: solvente, negativo, positivo y recubrimiento de placa. Se indica con **** diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$), el tratamiento de AO no indica diferencias significativas con los controles solvente ni negativo. Se destaca en rojo el resultado entre el control negativo y positivo que presenta una actividad contraria a la misma en los experimentos

preliminares. Todos los valores se muestran como promedio \pm desviación estándar.

4.3. Evaluación de hepatotoxicidad por conteo de neutrófilos

En este experimento resalta el resultado del conteo de neutrófilos del tratamiento de control positivo EtOH 1,7%, ya que, de forma similar a lo que ocurrió en el caso del tamaño de gránulos de lípidos, son los hígados expuestos a E3 los que tuvieron un mayor número de neutrófilos. Estos resultados no se condicen con el resultado que uno esperaría: una mayor cantidad de neutrófilos en el tratamiento con EtOH, por lo que, en este caso, el control positivo resultó poco confiable para comparar con cualquier otro tratamiento.

En la evaluación indirecta de hepatotoxicidad por AO a través de la identificación de inflamación evidenciada por un aumento en la presencia de neutrófilos en el hígado (Fig. 12), los resultados obtenidos mostraron que las larvas expuestas al tratamiento AO1 sólo presentan diferencia significativa con el tratamiento de control positivo EtOH 1,7% ($p = 0,0134$), pero como ya se mencionó esto es solo atribuible al comportamiento anómalo del control positivo en este experimento.

En el caso del tratamiento con BSA el conteo de neutrófilos no arroja diferencias significativas entre los tratamientos con toxina como tampoco lo hace con el control negativo.

Con respecto a la relación de las toxinas con los solventes, ninguna de las concentraciones probadas mostró diferencias significativas con sus respectivos tratamientos de solvente con DMSO ($p > 0,9999$ para ambos casos), por lo que no es posible ni afirmar ni descartar una respuesta respecto al movimiento de neutrófilos por interferencia del solvente. En ambos casos (concentración alta y baja) hay tendencias contrarias respecto al número de neutrófilos, por lo que de repetir esta experiencia se sugeriría aumentar el número de larvas, en búsqueda de tener resultados más significativos respecto a estas relaciones.

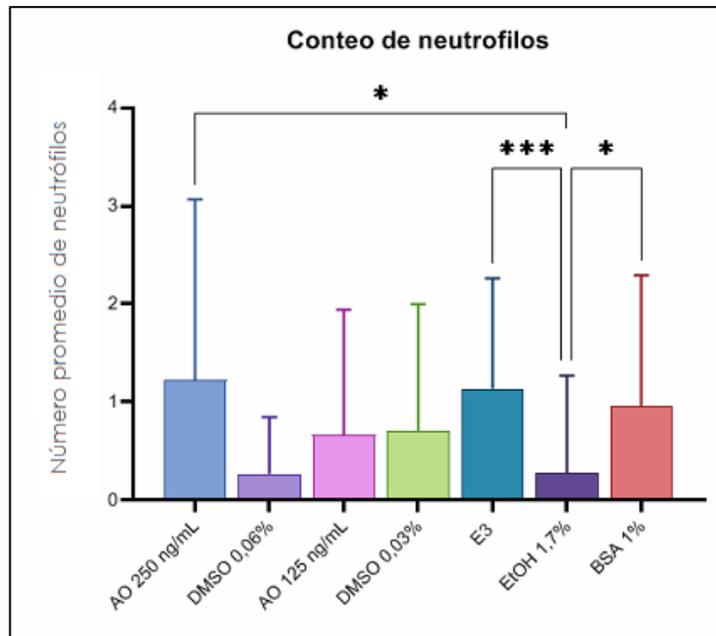


Figura N°12.-Conteo de neutrófilos en hígados diseccionados. Número promedio de neutrófilos detectados en hígados de larvas de pez cebra expuestas por 24 horas a distintos tratamientos. Se destacan con asteriscos (*) diferencias significativas. * $p = 0,0134$; *** $p = 0,0001$. Test de Kruskal-Wallis

DISCUSIÓN

El principal objetivo de esta investigación fue la evaluación del daño hepático en larvas de pez cebra frente a la exposición a AO por inmersión. Para esto se buscaron distintos criterios o indicadores para cuantificar el daño. De los indicadores probados fue el tamaño de gránulos de lípidos, a través de la medida de área de estos, el único indicador que arrojó resultados significativos entre los tratamientos. Este resultado está asociado a una acumulación de lípidos en el hígado llamada esteatosis. El desarrollo de esteatosis en las larvas tras ser expuestas a AO evidencia como esta toxina causa daño en el funcionamiento normal del hígado de los organismos estudiados.

Otros autores han evaluado la toxicidad del AO en el desarrollo de peces tanto en pez cebra como otros modelos biológicos. Escoffier et al. (2007) probaron exponer a distintas concentraciones de AO a embriones de peces medaka (*Oryzias latipes*) mediante inmersión por 48 h, la toxina provenía tanto de cultivos del dinoflagelado *Prorocentrum* como de extracto puro de AO (con valores entre 0,12 y 1,2 mM AO eq). Concentraciones entre 180 y 220 ng/mL de AO puro, redujeron la tasa de supervivencia embrionaria en un 70–100%. Además, para concentraciones mayores (520 ng/mL) reportan un crecimiento cuantitativo de las áreas del hígado y del tracto digestivo. Estos antecedentes son concordantes con nuestro resultado que indica que el AO no induce un aumento del tamaño del hígado ya que las dosis ensayadas por estos autores están por sobre lo ensayado en esta tesis.

Otros estudios muestran como el pez cebra es sensible al AO en sus primeras etapas de vida. Larvas de entre 1 y 5 dpf expuestas a altas concentraciones de AO (8000 ng/mL de AO por inmersión durante 24 h) presentaron un retraso en el desarrollo y alteraciones macroscópicas como edemas pericárdicos, ciclopía y reducción del eje anteroposterior (Figuroa et al., 2020). En concentraciones similares (7500 ng/mL de AO) pruebas con el pez marino *Sparus aurata* evidenciaron que el AO induce alteraciones importantes de parámetros enzimáticos y al mismo tiempo daño histopatológico en el tejido hepático como dilatación vascular, hiperemia capilar, y desintegración de la membrana hepatocelular (Souid et al., 2018). Pruebas respecto a la expresión de genes en peces adultos de pez cebra donde se inyectaron al hígado 176 ng/mL de AO, mostraron como ante la presencia de la toxina 55 genes se regularon

significativamente aumentando su expresión y 36 se regularon a la baja en el tejido hepático. Estos genes estaban involucrados en la actividad de la proteína fosfatasa, actividad del factor de traducción, unión a proteínas de choque térmico, así como actividad del transportador transmembrana (Zhang et al., 2014). Estos resultados brindan información respecto a las vías de lesión hepática que induce el AO en peces, dando sustento a la búsqueda de criterios de daño hepático como indicadores de presencia de AO. Los resultados obtenidos indican que el hígado resulta ser un órgano muy sensible a esta toxina, razón por la que es propio pensar en que el uso del daño de este órgano, pueda ser potencialmente utilizado como un indicador de la presencia de esta biotoxina marina en el ambiente, o en alimentos.

Por otra parte, aunque estas experiencias emplean concentraciones muchísimo más altas a las que se utilizaron en este trabajo, indican que el AO induce daño en peces y que si bien en nuestra experiencia con una baja concentración de AO no existe presencia de indicadores fenotípicos de toxicidad si hay un resultado positivo a hepatotoxicidad. Específicamente el aumento del tamaño de gránulos de lípidos en el hígado sugeriría una respuesta toxica de los organismos a concentraciones mucho más bajas de las que se han reportado en la literatura.

Otro objetivo planteado en esta tesis fue el definir un adecuado control positivo de daño hepático para los experimentos en los que se expondrían larvas a AO. Varios investigadores mencionan al etanol en una concentración del 2% como un buen control positivo de daño hepático (Cornet et al., 2017; Howarth et al., 2011). La razón es que esta sustancia ha dado resultados positivos como precursor de hígado graso tanto en mamíferos, como humanos o ratones (Marsano et al., 2003; You & Crabb, 2004), como también en peces (Passeri et al., 2009). Sin embargo, Maes et al. (2012) indican que al ser una sustancia psicoactiva y teratogénica debe ser utilizada con cautela con peces cebra. En esta misma investigación los autores señalan que el rango de concentración máxima tolerada por este organismo es de 0,5 a 1,5% dependiendo del estadio en que se encuentre.

Sin embargo, en nuestra experiencia las larvas expuestas a una concentración de 2% de etanol mostraron respuestas distintas a las reportadas por otros autores. La curvatura corporal y en mayor medida los edemas que presentaban las larvas de este tratamiento mermaban su calidad

como modelo de estudio, por lo que no recomendamos la utilización de concentraciones iguales o mayores a 2% de esta sustancia en larvas de pez cebra de 5 dpf; por riesgo de malformaciones. Por otra parte, las concentraciones que Maes et al. (2012) indican son toleradas por larvas de pez cebra (menores a 1,5%) no mostraron en el sector del hígado una tinción visible ante la tinción RO. Por lo anterior, es que se utilizó una concentración del 1,7%, ya que, en las larvas expuestas a esta concentración, fijadas y teñidas permitieron observar con mayor facilidad el hígado; sin embargo, en el proceso de disección se pudo constatar una fragilidad en el tejido del hígado que no se repitió en el resto de los tratamientos. Es por esta razón que muchas veces el hígado no era extraído en su totalidad y con frecuencia se rompían los extremos de este. Muchos de los hígados tratados no pudieron ser procesados en las pruebas de conteo de neutrófilos o tamaño de gránulos por el deterioro del tejido, por lo que no recomendamos el tratamiento con etanol para procedimientos que requieran la disección del hígado.

Otros autores han utilizado otros tóxicos como control positivo de esteatosis tales como la 3,4-dicloroanilina (Park et al., 2020) y fármacos como paracetamol, aspirina, finasterida y ácido fusídico, estos dos últimos reportados específicamente para esteatosis (Cornet et al., 2017; He et al., 2013). Al probar su calidad de control positivo sería conveniente evaluar el efecto que tiene en la integridad del tejido hepático, y no sólo en la obtención de imágenes; para no generar interferencias en el uso de parámetros como tamaño de gránulos de lípidos.

El incluir el recubrimiento de placas surge por la información respecto a cómo el poliestireno (PS), entre otros tipos de plásticos, es capaz de retener AO disuelto en sistemas acuáticos (Costa et al., 2020). Para evitar entonces su absorción y por ende la disminución de toxina disuelta en los pocillos se decidió optar por usar BSA como barrera entre la placa y la toxina de nuestras soluciones. Este tratamiento se utiliza con el mismo fin en inmunoensayos que utilizan tanto ácido okadaico o microcistinas; toxina muy similar al AO (Leonardo et al., 2018; Reverte et al., 2013). Las albúminas son las proteínas más abundantes en el sistema circulatorio de una amplia variedad de organismos. Son responsables de la distribución de varios compuestos endógenos con solubilidad limitada en agua, incluidas hormonas, péptidos, ácidos grasos libres, calcio y otros iones. Maes et al. (2012), probaron la efectividad del BSA como vehículo transportador por su utilidad potencial como suministro de moléculas pequeñas

a larvas de pez cebra. Esto autores indican que la albúmina actúa como vehículo de más del 70% de los fármacos utilizados en humanos y concluyen que en larvas desde los 5 dpf no existen efectos fenotípicos inducidos por esta sustancia en concentraciones sobre el 2%. Estos antecedentes respaldan los resultados que obtuvimos en la etapa de pruebas de toxicidad, en donde el recubrimiento de BSA de las placas no generó ni malformaciones ni mortalidad en las larvas de 5dpf. Pero, a pesar de que según los resultados arrojados por HPLC el BSA ayudaría a reducir hasta en un 60% la absorción de AO por parte de la placa, la evaluación de efecto inflamatorio mediante el conteo de neutrófilos indicó que el tratamiento de BSA aumentó el número de neutrófilos en las larvas, incluso más que en el control positivo. Esto evidenciaría una interferencia por parte del BSA en la respuesta del sistema inmune de las larvas por lo que este tratamiento no parecería ser el más idóneo para las características de nuestro diseño experimental. Morsch et al. (2019) inyectó BSA en hígados de larvas de pez cebra y reportó que en sólo 5 minutos el BSA se acumuló en las células endoteliales sinusoidales del hígado. En base a esto, se podría sugerir dada la característica de las larvas de absorber pequeñas moléculas diluidas en el agua circundante a través de la piel, el intestino y las branquias (He et al., 2013), pudieron también absorber moléculas de BSA, las que pudieron a su vez haber sido detectadas por el sistema inmune como un agente externo enviando a los neutrófilos al hígado, órgano en el que podría haberse acumulado. Esto entregaría antecedentes similares a los que refieren al BSA la característica de ser un estresor fisiológico del sistema inmune en embriones de pez cebra y que incluso señalan la concentración del 1% como un inductor del sistema inmunitario en estos organismos (Widatama & Retnoaji, 2021).

A pesar de lo anteriormente mencionado, hay que considerar que la albumina es una proteína que se genera en el hígado y es similar en casi un 80% a la albumina de suero humano (HSA) (Widatama & Retnoaji, 2021), ambas de plegamiento y estructura similar. La HSA es usada para desinflamar el hígado en pacientes humanos con cirrosis hepática ya que la albumina tendría la propiedad de reducir la inflamación sistémica característica de esa enfermedad. Por lo tanto, al no concordar entre esta respuesta antiinflamatoria y los resultados de nuestra experiencia respecto a inflamación se sugiere buscar otra alternativa al recubrimiento de

placas de plástico o el trabajo con material inerte que no interactúe con las soluciones como el vidrio.

Como se mencionó anteriormente, el tamaño del hígado es un criterio utilizado con frecuencia para determinar si existe o no esteatosis en larvas, ya que junto a la acumulación de lípidos el hígado tiende a sufrir una hepatomegalia, correspondiente al aumento del tamaño del hígado, producido por la retención, y por lo tanto acumulación, de lípidos (Passeri et al., 2009). Varios trabajos que utilizan esta medida como referencia se aprovechan de la piel traslucida de las larvas y miden el contorno del hígado (Cornet et al., 2017; He et al., 2013; Park et al., 2020). El hígado en una vista dorsolateral se sitúa por detrás del pericardio y por delante del intestino, posee una estructura globular y una coloración clara, la que suele oscurecerse tras ser expuesto a sustancias que generen daño en el órgano (He et al., 2013). Al hacer el ejercicio de la disección de hígados observamos que este tiene una forma similar a una herradura con dos lóbulos asimétricos más delgados que la parte central (Fig. 13), por lo que posiblemente se presente una subestimación de su tamaño al utilizar solo la vista lateral para tal medida, por esta razón se definió buscar otra medida para hacer esta evaluación, eligiendo finalmente una vista ventral para fotografiar y medir el hígado de las larvas teñidas. A pesar de que en los ensayos con control positivo se observó una clara diferencia significativa en el área medida en vista ventral, pero no en vista lateral (Fig. 6), en los experimentos definitivos con AO, la medida de este órgano no entregó resultados significativos respecto a si existía o no una diferencia en su tamaño la larvas expuestas o no a la toxina. Esto podría deberse al ruido que generaba en las fotografías la doble tinción de SBB + OR que, a pesar de tener un paso de despigmentación en su protocolo, no parecería ser suficiente y generaba interferencias que muchas veces significó no localizar claramente los márgenes del hígado. Se sugiere, en caso de replicar esta experiencia y buscar realizar mediciones del hígado en larvas sin disectar: (1) despigmentar completamente a las larvas de pez cebra y (2) aplicar sólo una tinción de ser posible, en el caso específico de los experimentos de tamaño de hígado sólo sería necesaria la tinción de OR.



Figura N°13.- Hígado de larva de pez cebra de 5dpf disectado, teñido con RO. Se observan dos lóbulos asimétricos, uno más delgado que el otro y el sector central del órgano más ancho. (Aumento 100x)

A pesar de todas las complicaciones metodológicas, propias de un trabajo que busca estandarizar técnicas en el laboratorio, pudimos ver como efectivamente el tratamiento por inmersión con AO arroja resultados que indican una disminución en la calidad del sistema hepático de las larvas. El aumento en el tamaño de los gránulos producto de una posible esteatosis resulta ser un buen indicador de hepatotoxicidad, y a pesar de que en esta experiencia las dosis utilizadas superan por casi un orden de magnitud a las concentraciones de AO indicadas como máximo permitido para tejido de mariscos, este estudio marca un precedente respecto a nuevas formas de medir daño hepático que en un futuro; solucionando los problemas metodológicos mencionados, podría implementarse como una técnica de detección de AO complementaria a las técnicas oficiales actuales.

CONCLUSIONES

1. Se acepta la hipótesis planteada ya que nuestros resultados indican que efectivamente las larvas de pez cebra expuestas por inmersión al AO durante 24 h presentan evidencias de hepatotoxicidad cuantificables y estadísticamente significativas.
2. El tamaño de los gránulos de lípidos es el mejor indicador de daño hepático producido por AO de los evaluados en esta investigación, lo que podría ser un criterio adaptable a un método de detección de toxina complementario a los existentes. Para esto se sugiere repetir el experimento mejorando las condiciones utilizadas en esta tesis exploratoria.
3. El etanol a 1,7% resulta ser un buen control positivo a hepatotoxicidad y no presenta efectos ligados a efectos sub-letales.
4. El recubrimiento con BSA en las placas como alternativa para evitar la pérdida de toxina por adsorción de plástico genera interferencia en los resultados de daño hepático por lo que no se recomienda su uso para los fines mencionados.

LITERATURA CITADA

- Ahmed, A. U. (2011). *An overview of inflammation : mechanism and consequences*. 6(4), 274–281. <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1123-9>
- Álvarez, G. (2010). Sistema de detección de biotoxinas marinas, el cambio a la aplicación de técnicas de alta sensibilidad. *Gira de Inocuidad Alimentaria - INFOOD 2010*, 26.
- Anderson, C. R., Moore, S. K., Tomlinson, M. C., Silke, J., & Cusack, C. K. (2015). Living with Harmful Algal Blooms in a Changing World: Strategies for Modeling and Mitigating Their Effects in Coastal Marine Ecosystems. In *Coastal and Marine Hazards, Risks, and Disasters*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396483-0.00017-0>
- Anderson, D., Andersen, P., Bricelj, V. M., Cullen, J. J., & Rensel, J. E. J. (2001). Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters. In *Apec #201-Mr-01.1*.
- Arteaga, C., Bustillos, A., & Gómez-Catalán, J. (2020). Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestos a extractos de sofrito de tomate. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 70(3), 182–190. <https://doi.org/10.37527/2020.70.3.004>
- Barrio, D. A., Avila Maniero, A. A., Piñuel, M. L., Solimano, P. J., Boeri, P. A., Zubillaga, M. F., & Cantoni, G. E. (2015). The zebrafish (*Danio rerio*) as a model system for biological evaluation of the toxins produced by the red tide. 1-9
- Berry, J. P., Gantar, M., Gibbs, P. D. L., & Schmale, M. C. (2007). The zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae ☆ 145, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.07.011>
- Chu, J., & Sadler, K. C. (2009). New School in Liver Development : Lessons from Zebrafish. 212, 1656–1663. <https://doi.org/10.1002/hep.23157>
- Cornet, C., Calzolari, S., Miñana-Prieto, R., Dyballa, S., van Doornmalen, E., Rutjes, H., Savy, T., D’Amico, D., & Terriente, J. (2017). ZeGlobalTox: An innovative approach to address organ drug toxicity using zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18040864>
- Costa, S. T., Rudnitskaya, A., Vale, C., Guilhermino, L., & Botelho, M. J. (2020). Sorption of

- okadaic acid lipophilic toxin onto plastics in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 157(May), 111322. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111322>
- Escoffier, N., Gaudin, J., Mezhoud, K., Chateau-joubert, S., Turquet, J., & Edery, M. (2007). Toxicity to medaka fish embryo development of okadaic acid and crude extracts of *Prorocentrum* dinoflagellates. 49, 1182–1192. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.02.008>
- FAO. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. <https://doi.org/https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Fellenz, N., Piñuel, L., Boeri, P., Fernández, C., & Barrio, N. (2014). *Desarrollo De Un Nuevo Bioensayo Para Detección De Toxinas Marinas En Moluscos Bivalvos Utilizando El Modelo Del Pez Cebra (Danio Rerio)*. 39–43.
- Figueroa, D., Signore, A., Araneda, O., Contreras, H. R., & García, C. (2020). Toxicity and differential oxidative stress effects on zebrafish larvae following exposure to toxins from the okadaic acid group. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 83(15–16), 573–588. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1793046>
- Fu, L., Zhao, X., Ji, L., & Xu, J. (2019). *Toxicon Okadaic acid (OA): Toxicity , detection and detoxi fi cation*. 160(August 2018), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.12.007>
- Hallegraeff, G., Anderson, D. M., Hole, W., & Cembella, A. (1995). *Manual on Harmful Marine Microalgae* (Issue 33).
- He, J. H., Guo, S. Y., Zhu, F., Zhu, J. J., Chen, Y. X., Huang, C. J., Gao, J. M., Dong, Q. X., Xuan, Y. X., & Li, C. Q. (2013). A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 67(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.10.003>
- Hernández Melo, L. D. (2019). Identificación inmunohistoquímica de neutrófilos en un modelo de inflamación en pez cebra (Danio rerio). *Instname:Universidad de Los Andes*. <http://hdl.handle.net/1992/45773>
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6–19. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>
- Howarth, D. L., Passeri, M., Sadler, K. C., Biology, R., Sinai, M., & Place, L. L. (2011).

- Drinks Like a Fish : Using Zebrafish to Understand Alcoholic Liver Disease*. 35(5), 826–829. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01407.x>
- Howarth, D. L., Yin, C., Yeh, K., & Sadler, K. C. (2013). *Defining Hepatic Dysfunction Parameters in Two Models of Fatty Liver Disease in Zebrafish Larvae*. 10(2). <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0821>
- Hu, W., Xu, J., Sinkkonen, J., & Wu, J. (2010). Polyketides from Marine Dinoflagellates of the Genus *Prorocentrum*, Biosynthetic Origin and Bioactivity of Their Okadaic Acid Analogues. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(1), 51–61. <https://doi.org/10.2174/138955710791112541>
- James, K. J., Carey, B., O'Halloran, J., Van Pelt, F. N. A. M., & Škrabáková, Z. (2010). Shellfish toxicity: Human health implications of marine algal toxins. *Epidemiology and Infection*, 138(7), 927–940. <https://doi.org/10.1017/S0950268810000853>
- Kim, H. G. (2006). Mitigation and Controls of HABs. In *Ecology of Harmful Algae* (Vol. 189, pp. 327–338). https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8_25
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). *Stages of Embryonic Development of the Zebrafish*. 10.
- Leonardo, S., Toldrà, A., Rambla-alegre, M., Fernández-tejedor, M., Andree, K. B., Ferreres, L., Campbell, K., Elliott, C. T., Sullivan, C. K. O., Pazos, Y., Diogène, J., & Campàs, M. (2018). Self-assembled monolayer-based immunoassays for okadaic acid detection in seawater as monitoring tools. *Marine Environmental Research*, 133(October 2017), 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.11.004>
- Maes, J., Verlooy, L., Buenafe, O. E., de Witte, P. A. M., Esguerra, C. V., & Crawford, A. D. (2012). Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. *PLoS ONE*, 7(10), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043850>
- Marsano, L. S., Mendez, C., Hill, D., Barve, S., & McClain, C. J. (2003). Diagnosis and treatment of alcoholic liver disease and its complications. *Alcohol Research and Health*, 27(3), 247–256.
- Mcgrath, P., & Li, C. (2008). *Zebrafish : a predictive model for assessing drug-induced toxicity*. 13(May). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.03.002>
- Morsch, M., Shami, G. J., Chung, R. S., & Braet, F. (2019). *Albumin uptake and distribution*

- in the zebra fish liver as observed via correlative imaging*. 374(November 2018), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.11.020>
- Park, J. S., Song, J., Park, J. S., Lee, S., Lee, J., Park, H. J., Kim, W. K., Yoon, S., & Chun, H. S. (2020). 3,4-Dichloroaniline promotes fatty liver in zebrafish larvae. *Molecular and Cellular Toxicology*, 16(2), 159–165. <https://doi.org/10.1007/s13273-019-00066-5>
- Passeri, M. J., Cinaroglu, A., Gao, C., & Sadler, K. C. (2009). Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology*, 49(2), 443–452. <https://doi.org/10.1002/hep.22667>
- Quan, Y., Gong, L., He, J., Zhou, Y., Liu, M., Cao, Z., Li, Y., & Peng, C. (2019). Aloe emodin induces hepatotoxicity by activating NF-κB inflammatory pathway and P53 apoptosis pathway in zebrafish. *Toxicology Letters*, 306(1166), 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.007>
- Ramírez-Zacarías, J. L., Castro-Muñozledo, F., & Kuri-Harcuch, W. (1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. *Histochemistry*, 97(6), 493–497. <https://doi.org/10.1007/BF00316069>
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P. A., Pizarro, G., Paz, B., Franco, J. M., & Blanco, J. (2014). Dinophysins toxins: Causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine Drugs*, 12(1), 394–461. <https://doi.org/10.3390/md12010394>
- Reverte, L., Garibo, D., Flores, C., & Caixach, J. (2013). *Magnetic Particle-Based Enzyme Assays and Immunoassays for Microcystins: From Colorimetric to Electrochemical Detection*.
- Rubiolo, J. A., López-alonso, H., Vega, F. V, Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2012). Comparative study of toxicological and cell cycle effects of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in primary rat hepatocytes. *Life Sciences*, 90(11–12), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.021>
- Sar, E. A., Ferrario, M. E., & Reguera, B. (Eds.). (2002). *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano* (Instituto).
- Schneider, A. C. R., Gregório, C., Uribe-Cruz, C., Guizzo, R., Malysz, T., Faccioni-Heuser, M. C., Longo, L., & da Silveira, T. R. (2017). Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver. *World Journal of Hepatology*, 9(8), 418–426. <https://doi.org/10.4254/WJH.V9.I8.418>

- Soud, G., Souayed, N., Haouas, Z., & Maarou, K. (2018). *Toxicon Does the phycotoxin Okadaic acid cause oxidative stress damages and histological alterations to seabream (Sparus aurata)? 144*. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.001>
- Suárez-Gomez, B. (2003). *Estudio sobre toxinas marinas de naturaleza polietérea . Aislamiento , elucidación estructural y evaluación de su potencial farmacológico*.
- Suarez-Isla, B., & Guzman, L. (1999). *FLORACIONES DE ALGAS NOCIVAS: Mareas Rojas y Toxinas Marinas* (Editorial).
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*, *31*(8), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>
- Trainer, V. L., Moore, S. K., Hallegraeff, G., Kudela, R. M., Clement, A., Mardones, J. I., & Cochlan, W. P. (2020). Pelagic harmful algal blooms and climate change: Lessons from nature’s experiments with extremes. *Harmful Algae*, *91*(March), 101591. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.009>
- Valdiglesias, V., Prego-Faraldo, M. V., Paáaro, E., Méndez, J., & Laffon, B. (2013). Okadaic Acid: More than a diarrheic toxin. *Marine Drugs*, *11*(11), 4328–4349. <https://doi.org/10.3390/md11114328>
- Vargas, R. A., Sarmiento, K., & Va, I. C. (2015). *Zebrafish (Danio rerio) : A Potential Model for Toxinological Studies*. *12*(5), 320–326. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1102>
- Villarroel G., O. (2004). Detección de toxinas paralizante, diarreica y amnésica en mariscos de la XI región por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y bioensayo de ratones. In *Ciencia y Tecnología del Mar: Vol. v. 27*. Comité Oceanográfico Nacional .
- Wang, K., Fang, X., Ma, N., Lin, Q., Huang, Z., Liu, W., Xu, M., Chen, X., Zhang, W., & Zhang, Y. (2015). Myeloperoxidase-deficient zebrafish show an augmented inflammatory response to challenge with *Candida albicans*. *Fish and Shellfish Immunology*, *44*(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.038>
- Widatama, D. A., & Retnoaji, B. (2021). Zebrafish Embryos Immune System induction with BSA as an initial Screening model for Covid-19 Treatment. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *75*, 0–9. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/755/1/012012>
- Xiong, J., Sha, H., Zhou, H., Peng, L., Wu, L., & Qiu, Y. (2019). *2,4-Dinitrotoluene (DNT)*

*Perturbs Yolk Absorption , Liver Development and Lipid Metabolism / Oxygen Transport
Gene Expression in Zebrafish Embryos and Larvae.*

- Yoganantharjah, P., Byreddy, A. R., Fraher, D., Puri, M., & Gibert, Y. (2017). *Rapid quantification of neutral lipids and triglycerides during zebrafish embryogenesis. 111*(October 2016), 105–111. <https://doi.org/10.1387/ijdb.160209yg>
- You, M., & Crabb, D. W. (2004). Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver: Role of sterol regulatory element-binding proteins. *Alcohol*, 34(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.07.004>
- Zhang, N., Li, H., Liu, J., & Yang, W. (2014). Gene expression profiles in zebrafish (*Danio rerio*) liver after acute exposure to okadaic acid. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 791–802. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.005>

Doble tinción de larvas de pez cebra 5-6 dpf con Sudan Black B y RedOil

1. Fijar larvas en PFA 4% por 2h a temperatura ambiente (RT), o toda la noche (ON) a 4°C.
2. Lavar en buffer fosfato salino (PBST) 3 veces por 5 min, en agitación constante (AC)
3. Teñir con solución de trabajo Sudan Black B filtrada (ideal 0,45 μ m) por dos horas, en AC.
4. Lavar por 5 min con etanol 70%. Observar bajo upa, y repetir solo de ser necesario, en AC.
5. Lavar en buffer fosfato salino (PBST) 3 veces por 5 min, en AC.
6. Despigmentar en una solución de KOH 1%/H₂O₂ 3%, sin agitación por 10-12 min.
NOTA 1: Usar solución fresca, preparar justo antes de usar.
7. Lavar en PBS tres veces por 5 min, en AC.
8. Deshidratar en propilenglicol 75% por 10 min, en AC.
9. Deshidratar en propilenglicol 100% por 10 min, en AC.
10. Teñir con solución de RedOil al 0.5% en Propilenglicol 100% en AC, toda la noche.
NOTA 2: Usar solución filtrada (ideal 0,45 μ m) almacenada a RT en oscuridad. Duración aproximada en estas condiciones 5-6 días.
11. Lavar con propilenglicol 100% por 15 min dos veces, en AC.
12. Rehidratar en propilenglicol 75% por 25 min, en AC.
13. Rehidratar en propilenglicol 50% por 25 min, en AC.
14. Almacenar en glicerol 80% a 4°C en oscuridad.

NOTA 3: Usar todas las soluciones a temperatura ambiente.