

Análisis de la actividad metabólica del NAD(P)H y FAD en embriones de peces cebra (*Danio rerio*) expuestos a concentraciones ambientales de 2,4-D e imidacloprid

Autores: Bianchi, Mariana*; Porcaro, Andrea; Ormaechea, María Valeria; Paravani, Enrique Valentín

Contacto: *mbianchi@ingenieria.uner.edu.ar

País: Argentina

Resumen

Las coenzimas NADH y FAD intervienen en múltiples vías metabólicas, vinculando procesos catabólicos como la oxidación de azúcares y lípidos con procesos anabólicos. La coenzima NADPH además tiene un rol fundamental en el mantenimiento de las defensas antioxidantes. Estas coenzimas son únicas, dado que sus funciones de desintegración de la fluorescencia llevan información directa sobre el estado metabólico de las células. Por medio de la microscopía de tiempo de vida de la fluorescencia (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, FLIM), además de visualizar la localización de los fluoróforos, es posible obtener información sobre el estado redox y la unión a proteínas de estas moléculas. Para corroborar los cambios metabólicos utilizando FLIM, un grupo de embriones de 24 hpf (horas post fecundación) se sometieron a hipoxia utilizando KCN (cianuro de potasio) como inhibidor de la cadena respiratoria. Se analizaron imágenes del ojo y de la cola de los embriones. En la cola se observó una disminución significativa de la relación redox, expresada como α_2 -NAD(P)H/ α_1 -FAD (NAD(P)H unido a proteínas /FAD unido a proteínas) y del índice α_2/α_1 para FAD (FAD libre/FAD unido a proteínas), con respecto al grupo control. Mientras que en el ojo no se observaron cambios significativos. Esta metodología se utilizó para evaluar los efectos del herbicida ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) y el insecticida imidacloprid en el metabolismo celular. Los embriones expuestos a una solución 0,8mg/L de 2,4-D mostraron una disminución de la relación α_2/α_1 para FAD, lo que indicaría una reducción del metabolismo. La exposición a una solución del 2% de imidacloprid no mostró efectos significativos con respecto al control.

Palabras claves: metabolismo; NADH; FAD; FLIM; pez cebra.

1. Introducción

El tiempo de vida de la fluorescencia es una propiedad específica de cada fluoróforo que es independiente de la intensidad de la fluorescencia y cambia con la alteración del entorno molecular. Las coenzimas NADH, NADPH (reducidas) y FAD (oxidada) poseen capacidad autofluorescente y ofrecen propiedades distintivas debido a que la descomposición de su fluorescencia brinda información directa sobre el estado metabólico de las células. Las formas fluorescentes de los cofactores NADH y NADPH son espectralmente indistinguibles (Hu et al., 2020), por lo tanto, se empleará la abreviatura NAD(P)H para referirnos a la señal combinada. La microscopía de tiempo de vida de la fluorescencia (FLIM) tiene el potencial de detectar cambios sutiles en el entorno celular de estos fluoróforos (Hu et al., 2020).

Se ha comprobado que la señal del tiempo de vida de la fluorescencia de NAD(P)H y FAD depende de su unión a proteínas. El NAD(P)H libre tiene una duración de fluorescencia corta, mientras que cuando está unido a proteínas, la duración se prolonga. Por otro lado, la unión de FAD a proteínas tiene el efecto opuesto (Hu et al., 2020). Las proporciones de NAD(P)H libre y unido a proteínas, así como de FAD libre y unido a

proteínas, varían según el tipo de metabolismo. Un cambio metabólico celular provoca alteraciones en las relaciones de las coenzimas NAD(P)H y FAD libres/asociadas a proteínas (Hu et al., 2020).

Los embriones de pez cebra se utilizan con mayor frecuencia en estudios toxicológicos debido a sus ventajas (Su et al., 2021). La inducción de hipoxia en estos embriones, utilizando KCN genera una supresión metabólica, al inhibir el sistema de transporte de electrones mitocondrial y en consecuencia la fosforilación oxidativa (Mendelsohn et al., 2008). En este trabajo utilizamos microscopía FLIM para corroborar el cambio metabólico producido por el KCN y, posteriormente estudiar las alteraciones metabólicas producidas por los contaminantes 2,4-D e imidacloprid bajo concentraciones ambientalmente relevantes.

2. Metodología

2.1. Animales

Los peces cebra (*Danio rerio*) adultos fueron criados en el Laboratorio de Química Ambiental de la Facultad de Ingeniería (LQA - UNER), utilizando peceras con aireación y ciclo de iluminación (14 hs de luz / 10 hs de oscuridad). Los embriones de 2 hpf fueron mantenidos en el LQA en placas de petri en estufa a 28,5°C hasta alcanzar las 24 hpf, ya que en este momento la ausencia de pigmentación permite buenas observaciones microscópicas. Posteriormente fueron decorionados bajo lupa estereoscópica utilizando agujas de 25G y separados en grupos para realizar los bioensayos.

2.2. Bioensayos

Para corroborar el cambio metabólico por medio de la técnica FLIM se utilizaron dos grupos, uno control y otro expuesto a una solución de KCN [1 mM] durante 4 minutos. Posteriormente, los embriones fueron fijados en formalina 10% buferada.

Para el ensayo de exposición a plaguicidas, se escogieron el herbicida 2,4-D y el plaguicida imidacloprid, con acciones distintas, por un lado, un herbicida y por el otro un insecticida, ambos ampliamente utilizados, con mecanismos de acción conocidos y aplicados en concentraciones ambientales. Se separaron los especímenes en tres grupos: un grupo control y dos grupos expuestos, uno a una solución de 2,4-D [0,8 mg/L] y el otro expuesto a una solución de imidacloprid [2%] durante 60 minutos (1 hora). A continuación, los animales fueron fijados en formalina 10% buferada. Todas las concentraciones empleadas fueron relevantes en los ambientes acuáticos y empleadas en los peces cebra (*Danio rerio*) (Gaaied et al., 2019; Özdemiir et al., 2018). Se utilizaron 20 embriones por grupo.

2.3. Obtención de las imágenes

Se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia láser confocal (Zeiss LSM 880 + AiryScan). Los tejidos de cinco embriones por grupo, fijados, fueron excitados con un láser de 405 nm (BDL-405-SMC, Becker y Hickl, Berlín, Alemania) con pulsos de 65 ps y frecuencia de repetición de 80 MHz. El haz atravesó un cubo de filtros pasabanda de 420-480 nm para capturar la señal de NAD(P)H y 500-550 nm para la señal del FAD. Las imágenes se obtuvieron con una lente de 40X (agua) y un tiempo de exposición de un minuto. Se seleccionaron dos regiones de interés para el análisis, el ojo y la cola. Para el procesamiento de las imágenes se realizó un análisis bi-exponencial. Se obtuvieron los parámetros T1 (componente corto del tiempo de vida de la fluorescencia), T2 (componente largo del tiempo de vida de la fluorescencia), α_1 (fracción del tiempo de vida del componente corto) y α_2 (fracción del tiempo de vida del componente largo) y Tm ($T_1 \times \alpha_1 + T_2 \times \alpha_2$). Se calculó la relación redox, que se conoce como la relación entre NAD(P)H unido a proteínas

y FAD unido a proteínas (Abu-Siniyeh y Al-Zyoud, 2020), y también se calculó la relación entre FAD libre/FAD unido a proteínas.

2.4. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics 23. Se realizó un ANOVA de un factor y un post test de Turkey. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados como diferencias significativas entre los grupos, mientras que valores de $p < 0,01$, fueron identificados como diferencias muy significativas entre los grupos.

3. Resultados

3.1. Exposición de los embriones de los peces cebra a KCN [1 mM]

Luego del análisis de los parámetros seleccionados, en los ojos de los embriones de los peces cebra analizados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los animales (Figura 1). Estos resultados se podrían corresponder con el tipo de metabolismo presente en el tejido, debido a que es principalmente una glucólisis aerobia (Kanow et al., 2017). Sin embargo, al momento de realizar el estudio en la sección de la cola de los embriones, se pudo evidenciar que el tratamiento provocó una disminución significativa de la relación redox (Figura 2a) y también se observó una disminución significativa de la relación α_2/α_1 para la coenzima FAD, indicando una disminución en la proporción FAD libre/FAD unido a proteínas (Figura 1 y 2b).

FIGURA 1. Relación α_2/α_1 del FAD en el ojo y cola del pez cebra control y tratado con KCN [1 mM].

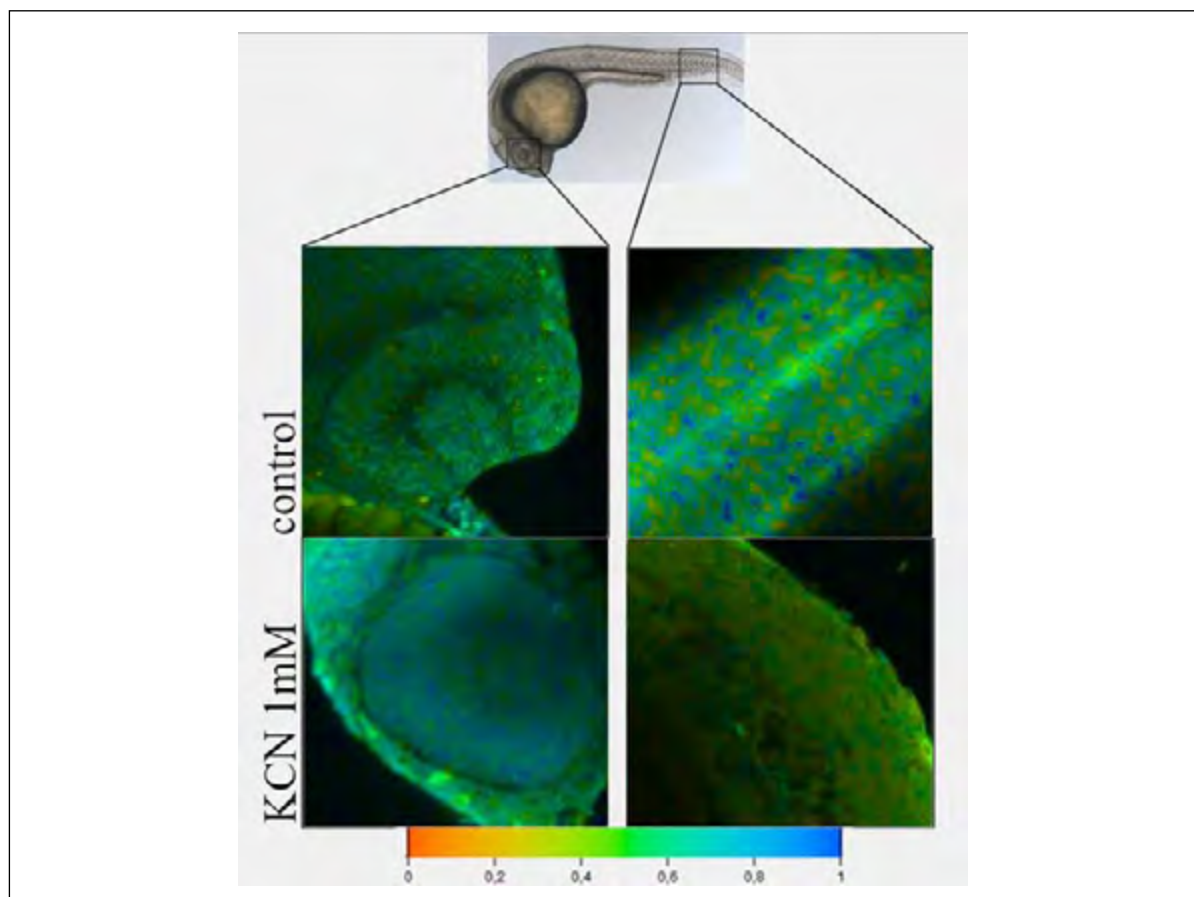
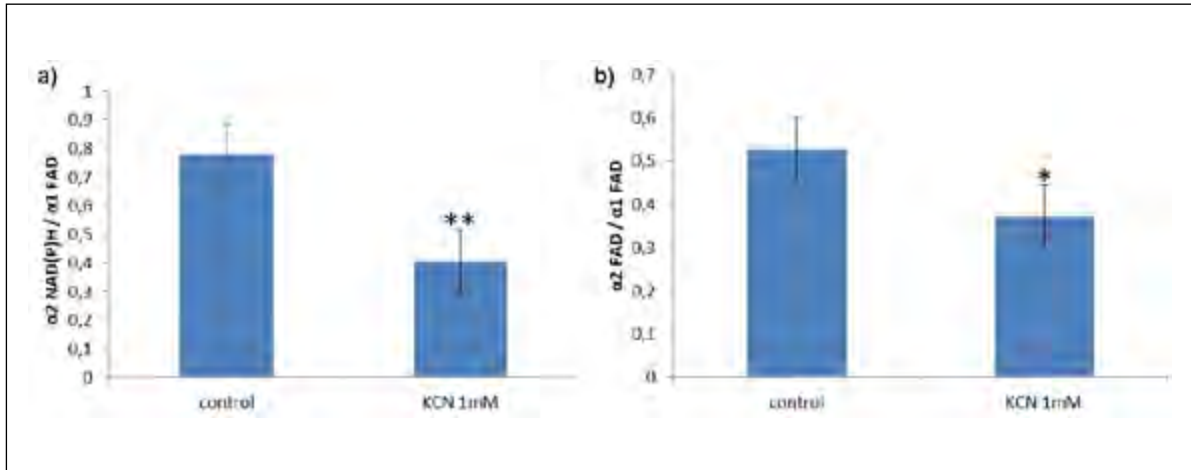


FIGURA 2. (a) Relación redox en cola de embriones de pez cebra control y expuestos a KCN 1mM, $\alpha 2$ NAD(P)H (unido a proteínas) / $\alpha 1$ FAD (unido a proteínas). (b) Relación entre $\alpha 2$ FAD (libre) / $\alpha 1$ FAD (unido a proteínas) en cola de embriones de pez cebra control y expuestos a KCN 1mM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 5$.

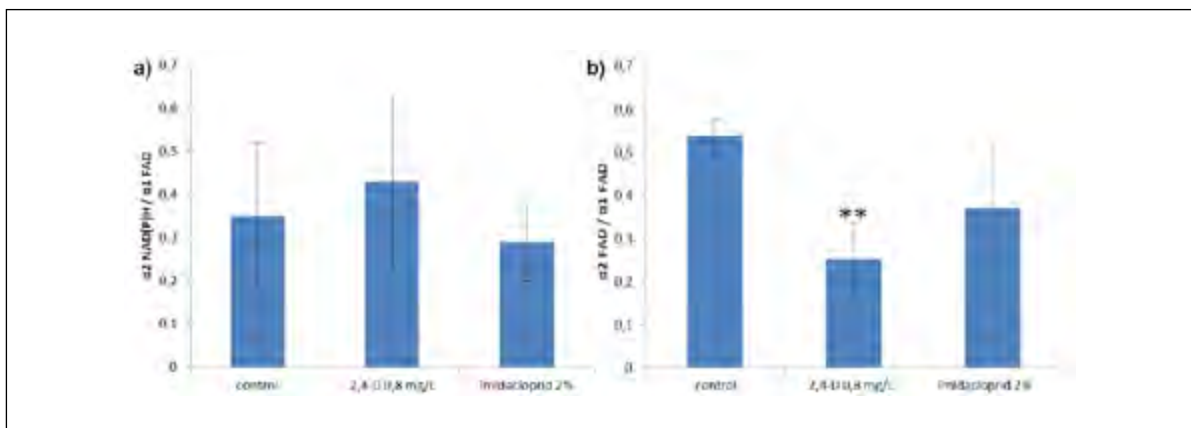


3.2. Exposición de los embriones de los peces cebra a los plaguicidas

Luego del análisis de los resultados obtenidos con la exposición a la solución de imidacloprid [2%] durante 60 minutos, se puede concluir que no se observaron cambios significativos en la cola de los embriones (Figura 3).

Al analizar los parámetros, cuando se expusieron los embriones a la solución con el herbicida 2,4-D [0,8 mg/L] durante 60 minutos, se encontró una disminución de la relación $\alpha 2/\alpha 1$ para la coenzima FAD (Figura 3), no así para la coenzima NAD(P)H, y la relación redox no presentó cambios significativos.

FIGURA 3. a) Relación redox en cola de embriones de pez cebra control y expuestos a pesticidas, $\alpha 2$ NAD(P)H (unido a proteínas) / $\alpha 1$ FAD (unido a proteínas). b) Relación entre $\alpha 2$ FAD (libre) / $\alpha 1$ FAD (unido a proteínas) en cola de embriones de pez cebra control y expuestos a pesticidas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 5$.



4. Discusión y análisis

4.1. Exposición de los embriones de los peces cebra a KCN [1 mM]

A partir de los resultados obtenidos con el tratamiento de KCN [1 mM], durante 4 minutos, se podría pos-

tular el siguiente mecanismo posible: durante la fosforilación oxidativa la coenzima NADH se convierte en NAD⁺ a través de la enzima NADH deshidrogenasa, para que esto ocurra el NADH tiene que estar unido a la enzima (alta fracción α_2 , NAD(P)H unido a enzimas); mientras que FADH₂ se convierte en FAD libre por acción de la Succinato Deshidrogenasa (baja fracción α_1 , FAD unido a enzimas). La inhibición del complejo IV de la cadena respiratoria por medio del KCN, provocaría una disminución del metabolismo oxidativo, y en consecuencia la inhibición de la oxidación del NADH (baja fracción α_2 , NAD(P)H unido a proteínas) y la inhibición de la oxidación de Succinato en Fumarato, reteniendo a la coenzima FAD unida a la enzima Succinato Deshidrogenasa (Chakraborty et al., 2016), (alta fracción α_1 , FAD unido a enzimas). Por lo antes propuesto, una disminución del metabolismo aerobio, en la cola de los embriones de los peces cebra, provocaría una disminución de la relación redox (α_2 NAD(P)H/ α_1 FAD) y de la relación α_2/α_1 del FAD.

4.2. Exposición de los embriones de los peces cebra a los plaguicidas

Los resultados obtenidos están en relación con lo reportado por Scheil y Köhler (2009), quienes encontraron que el insecticida imidacloprid no produjo un efecto significativo durante el desarrollo temprano del pez cebra a la concentración de 50 mg/l (Scheil y Köhler, 2009). Además, Tišler et al., (2009) no observaron toxicidad en el desarrollo de embriones de peces cebra al exponerlos a una concentración de 320 mg/L durante 48 h (Tisler et al., 2009).

Por otro lado, y tal como se muestra en la Sección de Resultados, cuando los embriones son expuestos durante 60 minutos a una solución del herbicida 2,4-D, es posible observar un cambio metabólico. En relación a esto, la disminución de la relación α_2/α_1 FAD (proporción de FAD libre/unido a proteínas) nos estaría indicando un aumento en la proporción de FAD unido a proteínas, lo que nos indicaría una disminución del metabolismo aerobio, y una retención del FAD en la enzima Succinato Deshidrogenasa (Chakraborty et al., 2016).

Salvo et al., (2015), utilizando un cultivo primario de células hepáticas del pez *Metynnis roosevelti* demostraron cambios significativos en el consumo de oxígeno celular y la excreción de amonio bajo la exposición a 2,4-D a diferentes concentraciones (0,275 μ g/L, 2,75 μ g/L y 27,5 μ g/L). El 2,4-D, aún a muy baja concentración en los medios de cultivo, mostró ser un potente desacoplante de la fosforilación oxidativa (Salvo et al., 2015). Además, en peces se observó una disminución del glucógeno del hígado, los músculos y los riñones y un aumento en el nivel de lactato después de exponerlos a agua contaminada con 2,4-D (Cattaneo et al., 2008; da Fonseca et al., 2008).

5. Conclusiones

Utilizando la técnica microscópica FLIM se pudo corroborar el cambio metabólico causado por KCN [1 mM], durante 4 minutos sobre los embriones de peces cebra. Además, se pudo visualizar una reducción del metabolismo aerobio al exponerlos a una solución de 2,4-D [0,8 mg/L], durante 60 minutos. La implementación de esta técnica demostró un gran potencial para estudiar cambios metabólicos sutiles y rápidos en embriones de peces cebra.

Los resultados obtenidos aportan al estudio de los efectos de contaminantes ambientales con respecto a su potencial toxicidad en el ambiente. Contar con ensayos, como los realizados, para evaluar posibles efectos resulta de gran utilidad como un screening preliminar de posibles contaminantes ambientales que afectan a los ecosistemas acuáticos y muchas veces al hombre.

Referencias bibliográficas

- Abu-Siniyeh, A. y Al-Zyoud, W. (2020). Highlights on selected microscopy techniques to study zebrafish developmental biology. *Laboratory Animal Research*, 36(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s42826-020-00044-2>
- Cattaneo, R., Loro, V. L., Spanevello, R., Silveira, F. A., Luz, L., Miron, D. S., Fonseca, M. B., Moraes, B. S. y Clasen, B. (2008). Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92(3), 133-137. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.07.004>
- Chakraborty, S., Nian, F.-S., Tsai, J.-W., Karmenyan, A. y Chiou, A. (2016). Quantification of the Metabolic State in Cell-Model of Parkinson's Disease by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep19145>
- da Fonseca, M. B., Glusczak, L., Moraes, B. S., de Menezes, C. C., Pretto, A., Tierno, M. A., Zanella, R., Gonçalves, F. F. y Loro, V. L. (2008). The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 416-420. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.08.006>
- Gaaied, S., Oliveira, M., Le Bihanic, F., Cachot, J. y Banni, M. (2019). Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. *Chemosphere*, 224, 289-297. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.125>
- Hu, L., Wang, N., Cardona, E. y Walsh, A. J. (2020). Fluorescence intensity and lifetime redox ratios detect metabolic perturbations in T cells. *Biomedical Optics Express*, 11(10), 5674- 5688. <https://doi.org/10.1364/BOE.401935>
- Kanow, M. A., Giarmarco, M. M., Jankowski, C. S., Tsantilas, K., Engel, A. L., Du, J., Linton, J. D., Farnsworth, C. C., Sloat, S. R., Rountree, A., Sweet, I. R., Lindsay, K. J., Parker, E. D., Brockerhoff, S. E., Sadilek, M., Chao, J. R. y Hurley, J. B. (2017). Biochemical adaptations of the retina and retinal pigment epithelium support a metabolic ecosystem in the vertebrate eye. *eLife*, 6, e28899. <https://doi.org/10.7554/eLife.28899>
- Mendelsohn, B. A., Kassebaum, B. L. y Gitlin, J. D. (2008). The Zebrafish Embryo as a Dynamic Model of Anoxia Tolerance. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(7), 1780-1788. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21581>
- Özdemir, S., Altun, S., Özkaraca, M., Ghosi, A., Toraman, E. y Arslan, H. (2018). Cypermethrin, chlorpyrifos, deltamethrin, and imidacloprid exposure up-regulates the mRNA and protein levels of bdnf and c-fos in the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 203, 318-326. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.190>
- Salvo, L. M., Malucelli, M. I. C., da Silva, J. R. M. C., Alberton, G. C. y Silva De Assis, H. C. (2015). Toxicity assessment of 2,4-D and MCPA herbicides in primary culture of fish hepatic cells. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(7), 449-455. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1018754>
- Scheil, V. y Köhler, H.-R. (2009). Influence of nickel chloride, chlorpyrifos, and imidacloprid in combination with different temperatures on the embryogenesis of the zebrafish *Danio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(2), 238-243. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9192-8>
- Su, T., Lian, D., Bai, Y., Wang, Y. Y. L., Zhang, D., Wang, Z. y You, J. (2021). The feasibility of the zebrafish embryo as a promising alternative for acute toxicity test using various fish species: A critical review. *Science of The Total Environment*, 787, 147705. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147705>
- Tisler, T., Jemec, A., Mozetic, B. y Trebse, P. (2009). Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 76(7), 907-914. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.002>