

Alteraciones en el desarrollo embrionario del pez cebra *Danio rerio* causadas por factores químicos

ANDRÉS TÉLLEZ MORA, EMILIO RAMÍREZ SÁNCHEZ, LAURO AYALA GARDUÑO

Resumen— *El desarrollo de los vertebrados puede alterarse por la exposición de los embriones a distintos factores químicos. El etanol y el cloruro de litio afectan el tiempo de eclosión de huevecillos del pez cebra así como el desarrollo normal del cráneo y columna vertebral del embrión a concentraciones de 1.5% y 0.3M respectivamente.*

I. INTRODUCCIÓN

Los efectos sobre la embriogénesis que producen el cloruro de litio (LiCl) y el etanol en específico son significativos porque ambas sustancias tienen antecedentes de causar daño al producto de mujeres embarazadas, como lo fue en la década de 1940, cuando se sustituyó el uso de cloruro de sodio por cloruro de litio en la alimentación y el uso del mismo en medicamentos para tratar la bipolaridad; así como el aumento de casos con espectro alcohólico fetal, que han aumentado en las últimas décadas. Para ésta investigación se utilizaron peces cebra de la especie *Danio rerio* como modelo experimental ya que el huevo en el que se encuentra el embrión es transparente y se pueden observar y cuantificar los efectos de las alteraciones. También el pez cebra, comparte con el humano las rutas metabólicas más importantes durante el desarrollo del embrión.

El espectro alcohólico fetal abarca un grupo de condiciones que pueden presentarse en una persona cuya madre ingirió bebidas alcohólicas durante el embarazo. Se estima que entre el 20% y 30% de las mujeres han consumido bebidas alcohólicas en algún momento del embarazo. Los signos de los desórdenes incluyen estatura baja, bajo peso, cabeza pequeña, baja inteligencia y microftalmia principalmente. Las personas con este tipo de padecimientos tienen la característica de mostrar un lento aprendizaje, así como conductas anti-sociales.

El etanol es un agente teratogénico que afecta el desarrollo cráneo-facial y cerebral en vertebrados. El cloruro de litio tiene antecedentes de haber causado daño en humanos cuando en los años 40 se sustituyó en productos alimenticios el cloruro de sodio por cloruro de litio, con el objetivo de eliminar problemas por exceso de sodio en pacientes. Esto

resultó en la muerte e intoxicación de varias personas así como malformaciones en el producto de mujeres embarazadas. El cloruro de litio y otras sales de litio han sido usadas como psicofármacos para tratar todo tipo de trastornos bipolares, modificando a las proteínas Marcks (Myristolated Alanine-Rich C-Kinase Substrate) y MRP (Multi-drug Resistance Proteins) que se vinculan con procesos relacionados al desarrollo del sistema nervioso. El LiCl está en la categoría D en relación a fármacos durante el embarazo, puesto que ha provocado múltiples muertes sin sobredosis accidentales.

Se ha observado que la exposición al cloruro de litio durante el desarrollo del embrión provoca alteraciones en la columna vertebral y en el proceso de cefalización.

El pez cebra es considerado como un modelo biológico para el estudio de la embriología ya que al ser un vertebrado, comparte con el humano algunas vías de señalización involucradas en el desarrollo del embrión.

La embriogénesis del pez cebra se divide en cuatro etapas, siendo cruciales las primeras veinticuatro horas ya que es cuando se pueden modificar las señalizaciones genéticas de las que depende la morfogénesis craneal y neuronal:

-Segmentación: Primera etapa que se caracteriza por múltiples procesos de mitosis hasta la formación del blastocele, que es la primera cavidad general de los vertebrados y que genera al blastocito.

-Gastrulación: Se genera una invaginación en el blastocele que dará lugar más tarde a la médula espinal. En esta etapa, el embrión se diferencia en 3 capas germinales: ectodermo (capa externa, de él se desarrolla el sistema nervioso), mesodermo y endodermo. Las capas mencionadas anteriormente contienen las instrucciones que llevarán el desarrollo del embrión. En esta etapa están presentes las vías de señalización WNT (Wingless iNTEgration Genes) y hedgehog.

-Neurulación: Las crestas neurales se unen para formar el tubo neural esbozo de la médula espinal y el encéfalo.

-Organogénesis: Es el proceso por el cual el ectodermo, mesodermo y endodermo se desarrollan en los diferentes órganos y estructuras del organismo.

ANDRÉS TÉLLEZ MORA Y EMILIO RAMÍREZ SÁNCHEZ pertenecen a la ESCUELA PREPARATORIA de la Universidad La Salle y realizaron el proyecto dentro del curso BIOLOGÍA V (Email: lauro.ayala@ulsa.mx).

El proyecto fue asesorado por el BIÓLOGO LAURO AYALA GARDUÑO

II. HIPÓTESIS

La exposición de los embriones de *Danio rerio* a etanol en concentraciones 0.5%, 1% y 1.5% causa anomalías como cráneo reducido y microftalmia. Los embriones expuestos al cloruro de litio en diferentes concentraciones (0.15M, 0.2M y 0.3M) desarrollan malformaciones en la columna vertebral y en el proceso de cefalización.

III. OBJETIVO

Determinar si la exposición al etanol y cloruro de litio en etapas tempranas del desarrollo embrionario de *Danio rerio* causa daños morfológicos en diferentes órganos y como repercuten en la vida del organismo.

IV. CONCEPTOS BÁSICOS

Agente teratogénico: Molécula que puede provocar mutaciones o alteraciones en el material genético.

Embriogénesis: Etapas del desarrollo desde la fertilización hasta el nacimiento o eclosión.

Microftalmia: Es una anomalía congénita (que aparece desde el momento del nacimiento) que se caracteriza por un tamaño anormalmente pequeño del globo ocular.

Cefalización: Hace referencia a la presencia de una región anterior (cabeza) bien definida, en la cual se agrupan los órganos del sistema nervioso central y los órganos de los sentidos.

Vía de señalización: Describe un grupo de moléculas que trabajan juntas para controlar una o más funciones de la célula. Después de que la primera molécula en una vía de señalización recibe una señal, ésta activa a las otras moléculas.

Organismo modelo: En biología es un organismo que se estudia para entender fenómenos biológicos particulares, que puedan darnos una idea de cómo funcionan esos procesos en otros organismos.

V. METODOLOGÍA PROPUESTA

Organismos utilizados: Se usó a *Danio rerio* (pez cebra) como modelo para el experimento. La variedad de los peces es silvestre; no manipulados genéticamente, de criadero controlado. Los animales se pusieron en peceras de reproducción dentro de redes cúbicas para obtener los huevecillos fertilizados. Dicha pecera estaba en condiciones controladas de agua a 28°C y pH 7, luz artificial con temporizador que encendía la lámpara de 6:00 a las 19:00 horas, diariamente.

Los peces eran alimentados con *Artemia salina* viva dos veces al día. Se prepararon concentraciones distintas de etanol (0.5%, 1% y 1.5%) y cloruro de litio (0.15M, 0.2M y 0.3M) en vasos de precipitados y se distribuyeron en pisetos. Las

concentraciones elegidas son equimolares de acuerdo con las concentraciones que se han reportado como tóxicas en estudios clínicos.

El uso de los peces cebra para la investigación fue autorizado por el colegio de biología de la Universidad La Salle México, campus Benjamín Franklin; misma institución donde la investigación fue llevada a cabo en el laboratorio de biología.

Parte I

1) La ovulación fue provocada con el encendido de la lámpara, cuando había embriones en el fondo de la pecera se succionaban con una pipeta y se mantenían en vasos con agua del acuario a 28°C.

2) Se separaron 140 embriones vivos los cuales se ubicaron en siete lotes de 20 organismos cada uno (un lote control y seis lotes experimentales). En el lote control usando pipetas de plástico, se trasladaron los embriones a cajas de Petri, con temperatura constante de 28°C. Aquí se identificaron etapas embrionarias usando el microscopio estereoscópico. Se separaron los embriones vivos y después se marcaron los envases que contuvieron a los mismos, colocándolos en una pecera de incubación donde se revisaron etapas embrionarias diariamente durante una semana, en condiciones normales. Se registró el crecimiento a las 24, 48 y 72 hpf (horas post fertilización) tomando fotografías.

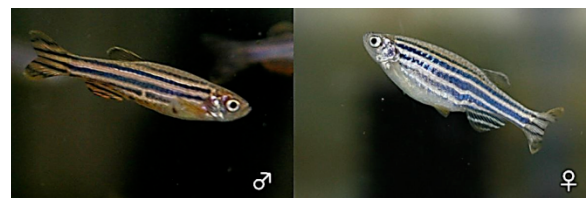
Parte II

Cada lote experimental (con 20 embriones cada uno) se puso en una caja de Petri quitando el exceso de agua. Fueron expuestos a etanol y cloruro de litio en las diferentes concentraciones señaladas anteriormente durante diez minutos; luego se enjuagaron con agua de acuario y se regresaron a los acuarios de incubación, dentro de un vaso de precipitados tapado con una malla para impedir que escaparan los alevines desarrollados.

Parte III

Después de tres días (entre 72 y 78 hpf), se identificaron y fotografiaron los embriones y los que mostraban malformaciones fueron depositados en un frasco con formol al 10%.

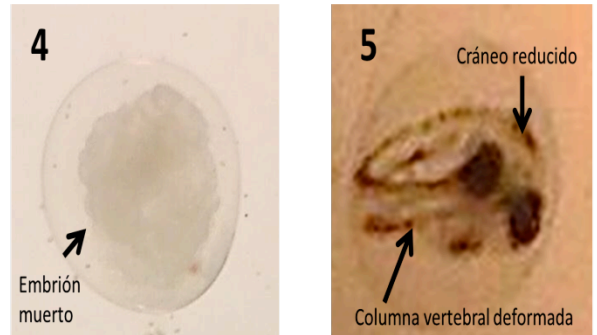
Peces cebra adultos de ambos sexos



Esquema que representa al acuario de reproducción y fertilización



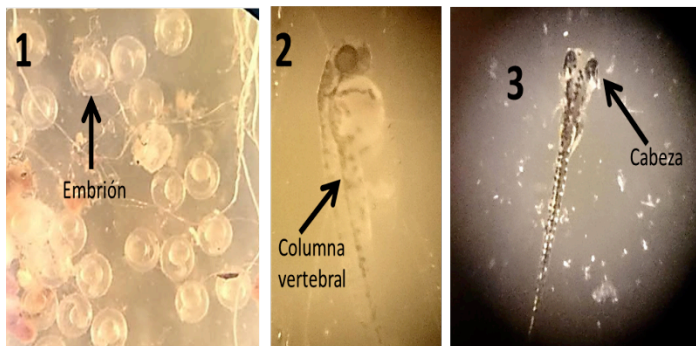
tamaño) doblez en la columna vertebral y menor tamaño; ojos reducidos y más juntos de lo normal así como una menor pigmentación corporal. El mayor efecto fue observado en la concentración de 0.3M.



LiCl 0.3M (la más alta concentración) – Algunos embriones murieron (fig. 4). Se muestran a los embriones a 78hpf y a una semana después de la fecundación. Ninguno de los embriones logró eclosionar en ese periodo de tiempo. Se puede observar un crecimiento anormal de los ojos y en el embrión de la fig. 5 se observa la columna vertebral de forma irregular.

VI. RESULTADOS OBTENIDOS

1) El grupo control presentó 18 alevines con crecimiento normal (90% de sobrevivientes). Se observó coloración oscura, desarrollo craneal, ocular y de la columna vertebral correspondiente a la etapa embrionaria adecuada.

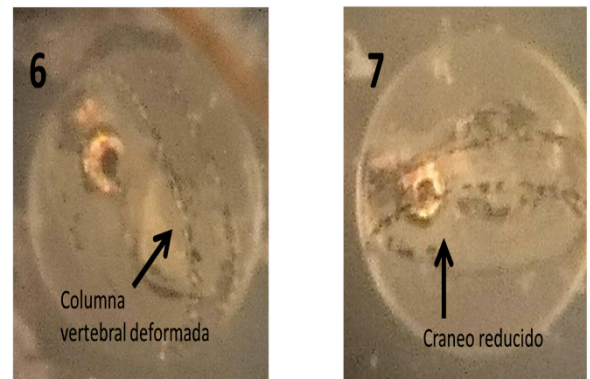


Grupo control: En la imagen se muestra el desarrollo normal de los embriones a 24hpf (horas post-fertilización) (1), 48hpf (2) y 78 hpf (3). La embriogénesis permite el crecimiento del alevín mostrando cefalización (formación del cráneo y encéfalo), columna vertebral (segmentación y morfogénesis) y ojos normales a los tres días de la eclosión (salida del huevo).

Los alevines fueron depositados en un acuario de crecimiento y continuaron su desarrollo normal en los meses posteriores al experimento. Los peces adultos se podrán emplear en proyectos similares con los siguientes alumnos.

2) En los lotes experimentales de LiCl se obtuvo una supervivencia de 80% (16 embriones) en la concentración de 0.15M; 60% en 0.2M (12 embriones) y 40% en 0.3M (8 embriones). Todos los embriones presentaron retraso en la eclosión (ninguno salió del huevo en una semana; siendo lo normal la eclosión a las 48 hpf), alteraciones en el cráneo (reducido de

3) En los lotes experimentales de Etanol, se obtuvo una supervivencia de 80% (16 embriones) en la concentración de 0.5%; 70% en 1% (14 embriones) y 60% en 1.5% (12 embriones). Todos los embriones presentaron retraso en la eclosión (ninguno salió del huevo en una semana; siendo lo normal la eclosión a las 48 hpf), alteraciones en el cráneo (reducido de tamaño) doblez en la columna vertebral y menor desarrollo; una menor pigmentación corporal. El mayor efecto fue observado en la concentración de 1.5%.



Etanol: 1.5% (la mayor concentración) Algunos embriones murieron. En las fig. 6 y 7 se muestran embriones después de las 78hpf, existen ciertos cambios en la columna vertebral (torsión y poco desarrollo) y una disminución del tamaño del cráneo. Los embriones no eclosionaron.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se observaron cambios morfológicos en los embriones que aumentaban su severidad de acuerdo a la concentración de las sustancias utilizadas.

En las concentraciones más altas (etanol 1.5% y cloruro de litio 0.3M), se observaron efectos significativos en cuanto al desarrollo embrionario normal del pez y retraso en el tiempo de eclosión de los embriones. Se identificaron malformaciones de la columna vertebral causadas por la exposición al cloruro de litio, y además se observó un crecimiento anormal del cráneo y ojos así como una disminución del espacio inter-ocular.

En cuanto al etanol, no se observaron rasgos compatibles con el espectro alcohólico fetal, sin embargo, hubo una leve disminución en el tamaño de los ojos en la exposición del etanol al 1.5%, pero esta no es clara y podría deberse a que no se contaron con los instrumentos de medición pertinentes que hayan podido mostrar estos rasgos con claridad o a que la exposición de dichas concentraciones en determinadas etapas ocasionara otro tipo de efectos a los esperados. En este experimento no se analizó si el fenotipo modificado se asocia a alteraciones en las vías de señalización a nivel molecular.

Para investigaciones futuras se propone estudiar la actividad de las vías de señalización WNT y hedgehog con sus respectivos genes los cuales se asocian con los procesos de desarrollo del embrión. Ciertos factores de transcripción como los de la vía WNT-beta-catenina pueden ser afectados por estas sustancias (cloruro de litio) y es probable que los procesos del desarrollo embrionario como la morfogénesis, no se puedan llevarse a cabo correctamente.

Estudios en roedores han proporcionado información importante en cuanto al espectro alcohólico fetal, al igual que otros padecimientos ocasionados por la exposición de sustancias durante el desarrollo embrionario. Aunque los modelos de roedores han sido de gran ayuda, aún no se tiene un concepto claro sobre cómo ciertas sustancias afectan el desarrollo embrionario a nivel molecular y celular debido a que el embrión crece dentro de la matriz de la hembra. Es por eso que el pez cebra es considerado como un modelo más acertado, ya que el huevo en el que se encuentra el embrión es transparente y se pueden observar y cuantificar los efectos de las alteraciones. El pez cebra al ser un vertebrado, comparte con el humano las vías de señalización que son fundamentales en el desarrollo del embrión.

Otros estudios en *Danio rerio* con una mayor concentración de las mismas sustancias y con exposición crónica de hasta 24 horas, lo que difiere mucho a las circunstancias en el que un embrión humano está expuesto en el vientre de la madre; demostraron en su mayoría un resultado letal hacia los embriones y no se lograron observar cambios en el pez después de la embriogénesis.

VIII. CONCLUSIÓN

La exposición temprana al etanol y al cloruro de litio provoca retraso en la eclosión y algunas malformaciones como el desarrollo anormal en la columna vertebral, el cráneo y el encéfalo, así como microftalmia, los cuales pueden perjudicar al organismo, proporcionando desventajas a su supervivencia.

REFERENCIAS

- [1] Dann CE, Hsieh JC, Rattner A, Sharma D, Nathans J, Leahy DJ (julio de 2001). «Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains». *Nature* 412 (6842): 86–90
- [2] Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Puder M, Daley GQ, Moon RT, Zon LI (
- [3] Gilbert, Scott (2005). «Biología del Desarrollo». Panamericana
- [4] Priyadarsini Kumar,^{ca} Twanda L. Thirkill, Jennifer Ji,^{cb} Louise H. Monte,^{cc} and Gordon C. Douglas Robert Oshima, Editor, Differential Effects of Sodium Butyrate and Lithium Chloride on Rhesus Monkey Trophoblast Differentiation. Aug 12, 2015. PubMed.
- [5] Grandjean EM1, Aubry JM, PubMed. *CNS Drugs*. 2009; 23(5):397-418. doi: 10.2165/00023210-200923050-00004. Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach: part III: clinical safety.
- [6] . Chengjin Zhang, Jared M. Frazier, Hao Chen, Yao Liu, Ju-Ahng Lee and Gregory J. Cole. Jun 11 2014, PubMed. Molecular and morphological changes in zebrafish following transient ethanol exposure during defined developmental stages
- [7] What is a cell? 2004. A Science Primer: A Basic Introduction to the Science Underlying NCBI Resources. NCBI.
- [8] Campbell, Biology, Pearson, 10th edition, 2015, pp. 1034-1085.