



Peix zebra o peix camaleó?



Adaptació del model a diferents àmbits de la recerca

Marta Barenys, Cristina Arteaga, Núria Boix, Joan M. Llobet, Jesús Gómez

GRET - Grup de Recerca en Toxicologia

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Seminaris de Recerca 2017



Introducció

Peix Zebra *Danio rerio*

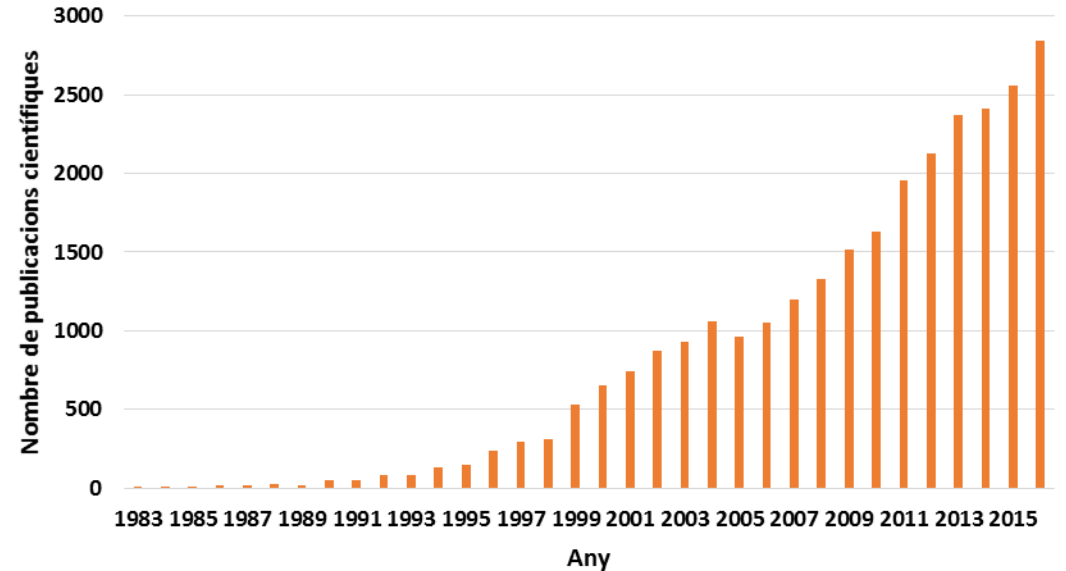
Peix tropical d'aigua dolça



~ 30 anys inici ús com a model de recerca
- biologia del desenvolupament
- genètica.

...des d'aleshores...

Cerca a PubMed: 'zebrafish'



Perquè està tenint tant èxit?

Genèticament és més similar a l'espècie humana que la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*)
el cuc (*Caenorhabditis elegans*)



És más fàcil de manipular, mantenir y criar que els ratolins o rates.





Introducció

Peix Zebra *Danio rerio*

Peix tropical d'aigua dolça



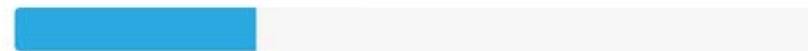
~ 30 anys inici ús com a model de recerca
- biologia del desenvolupament
- genètica.



- + Desenvolupament extrauterí
- + Transparència dels embrions
- + 200-300 embrions per posta
- + Segueix els principis de les 3R's

PEIX ZEBRA vs RATOLÍ

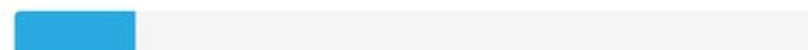
Cost mitjà per assaig



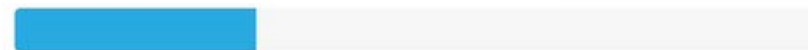
Similitud genètica amb humans



Quantitat de compost

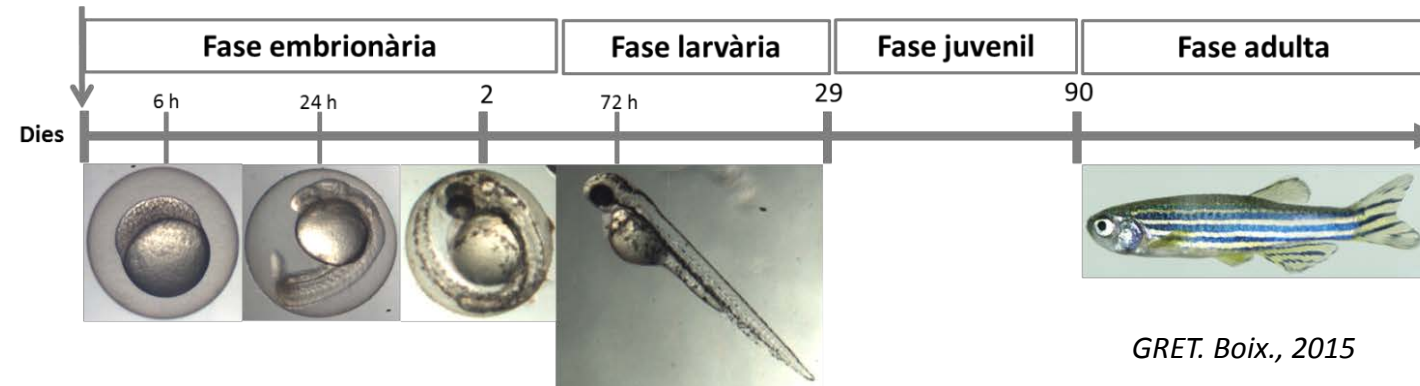


Temps per assaig



Font: Zebrafish LAB

Fecundació





Avaluació de la toxicitat – Toxicitat aguda

- Guideline per a l'avaluació de compostos químics: Test n°236

Objectiu → determinar la toxicitat aguda de compostos químics en estadis embrionaris de peix

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2

Effects on Biotic Systems

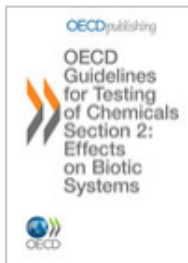
English

Also available in French

ISSN: 2074-5761 (online)

<http://dx.doi.org/10.1787/20745761>

45761



Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

English

Click to Access: PDF READ

OECD

26 July 2013

Pages: 22

ISBN: 9789264203709 (PDF)

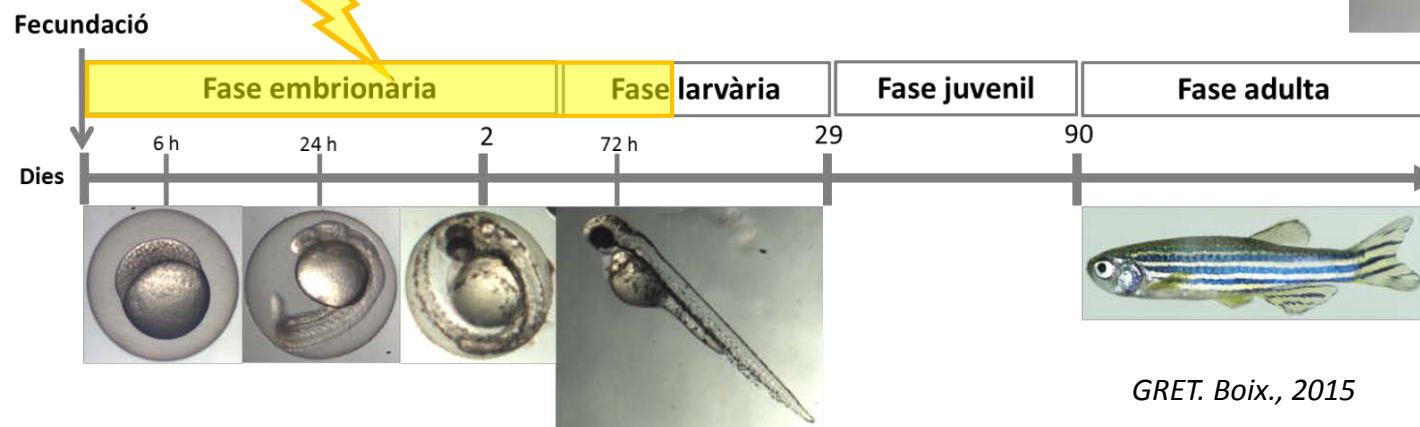
<http://dx.doi.org/10.1787/9789264203709-en>

OECD Test.236

	Exposure times			
	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
Coagulated embryos	+	+	+	+
Lack of somite formation	+	+	+	+
Non-detachment of the tail	+	+	+	+
Lack of heartbeat		+	+	+



GRET. Arteaga., 2017



GRET. Boix., 2015



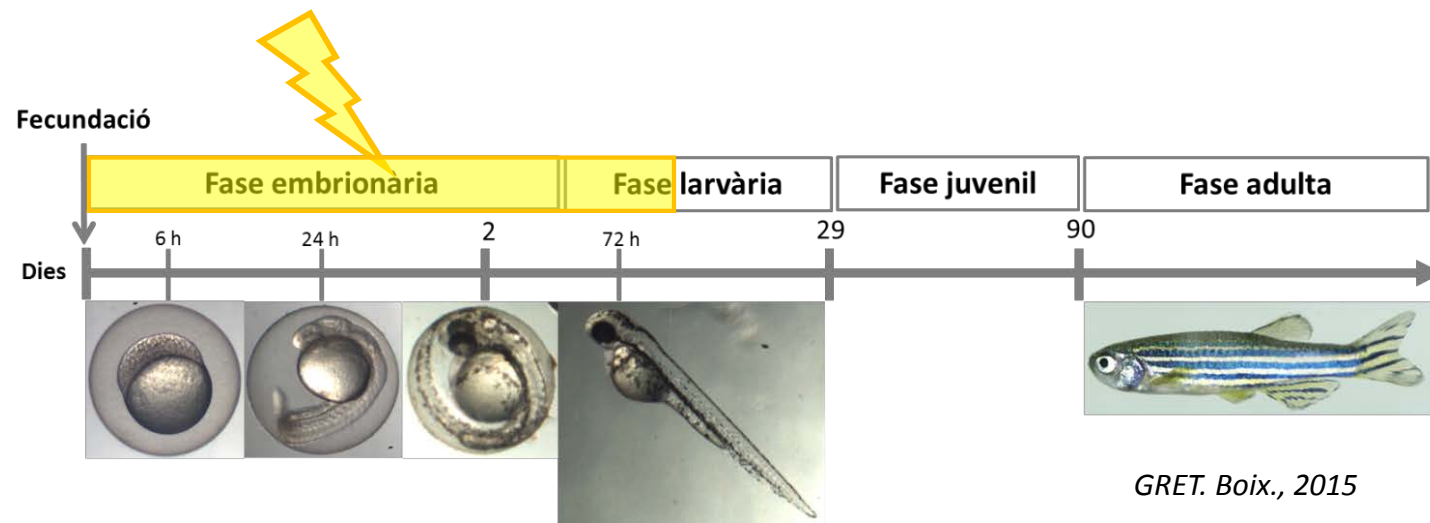
Avaluació de la toxicitat – Embriotoxicitat



- + Desenvolupament de l'ull
- + Moviment
- + Circulació sanguínia
- + Pigmentació
- + Aletes
- + Mandíbula

OECD Test.236

	Exposure times			
	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
Coagulated embryos	+	+	+	+
Lack of somite formation	+	+	+	+
Non-detachment of the tail	+	+	+	+
Lack of heartbeat		+	+	+

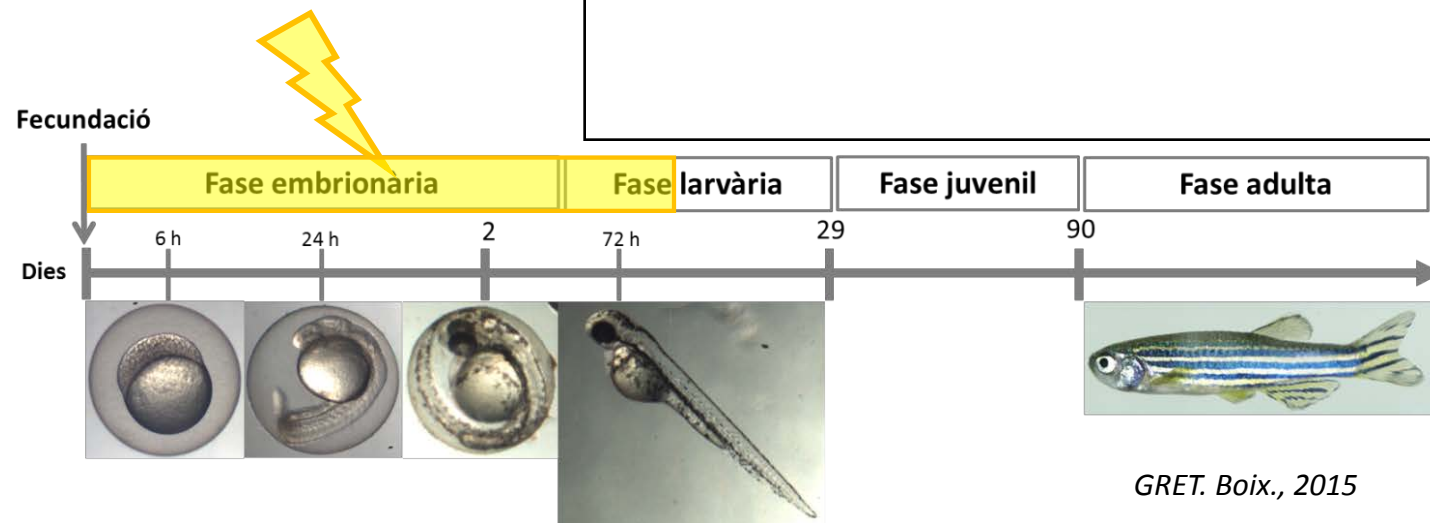
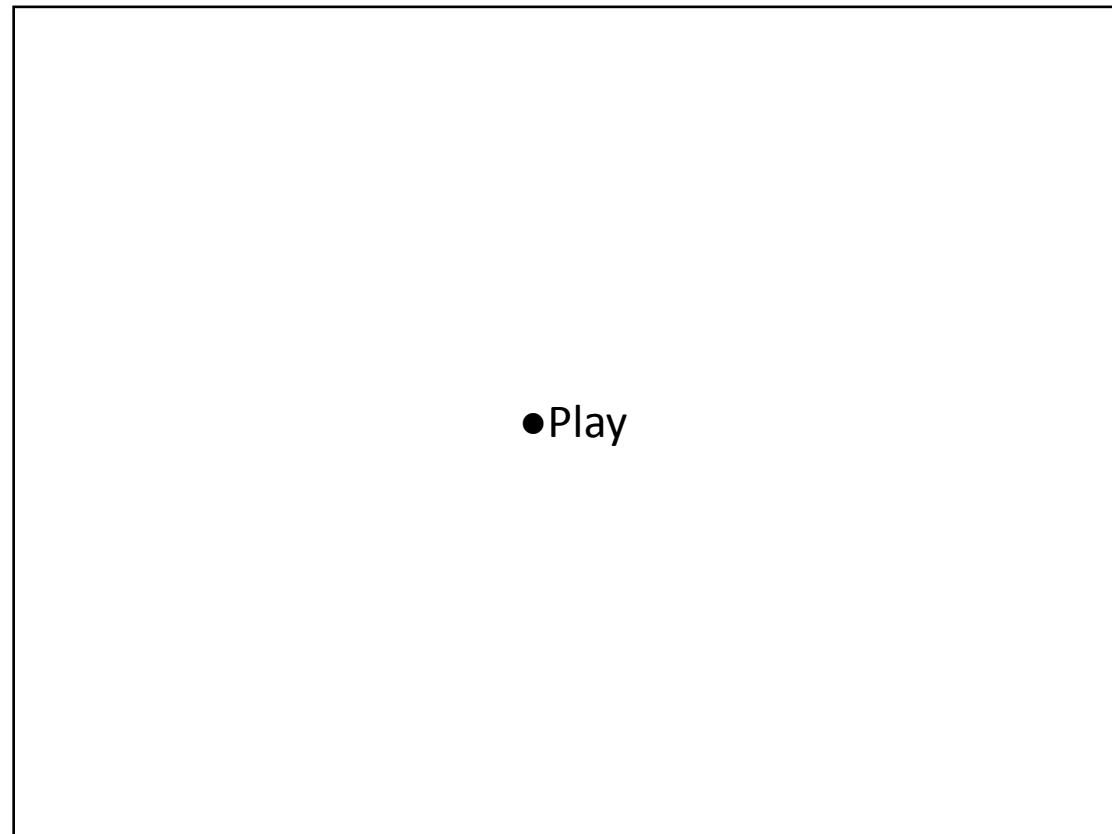




Avaluació de la toxicitat – Embriotoxicitat



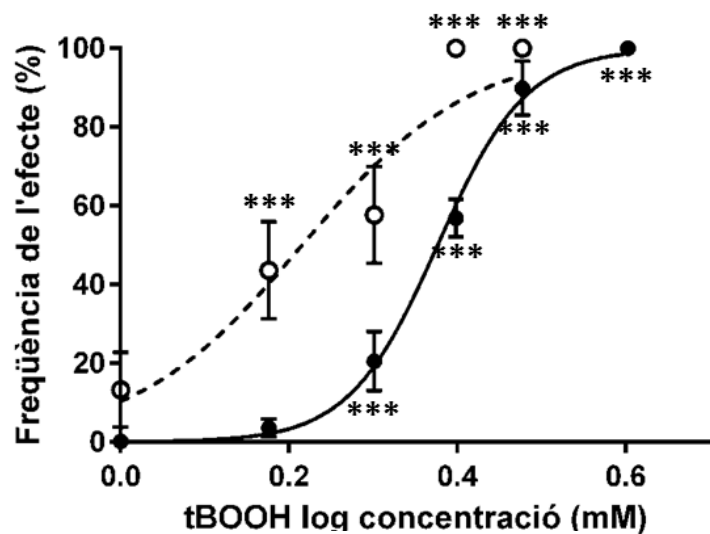
- + Desenvolupament de l'ull
- + Moviment
- + Circulació sanguínia
- + Pigmentació
- + Aletes
- + Mandíbula





Embriotoxicitat

Exemple resultat amb un inductor d'estrés oxidatiu: tBOOH



GRET. Boix., 2015

- Letalitat
- Anormalitats morfològiques

Hours of exposure	Reference in case of retardation	24	48	72
Detachment of the tail	0	1	2	3
Somite formation	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Eye development	1	2	2 + 1 for pigment	2 + 1 for pigment
Movement	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 2
Circulation	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 2
Heartbeat	No = 0	No = 0	Yes = 1	Yes = 2
Pigmentation of the head and the body	0	0	1	1
Pigmentation of the tail	0	0	1	1
Yolk extension nearly empty				
Pectoral fin	0	0	0	1
Protruding mouth	0	0	0	1
Hatching	No = 0	No = 0	No = 0	Yes = 1

Beekhuijzen et al., 2015

7

12

17

Exemples



Control



Retard en el desenvolupament



Edema cardíac



Disminució de la pigmentació

GRET. Boix., 2015



UNIVERSITAT DE BARCELONA

GRET

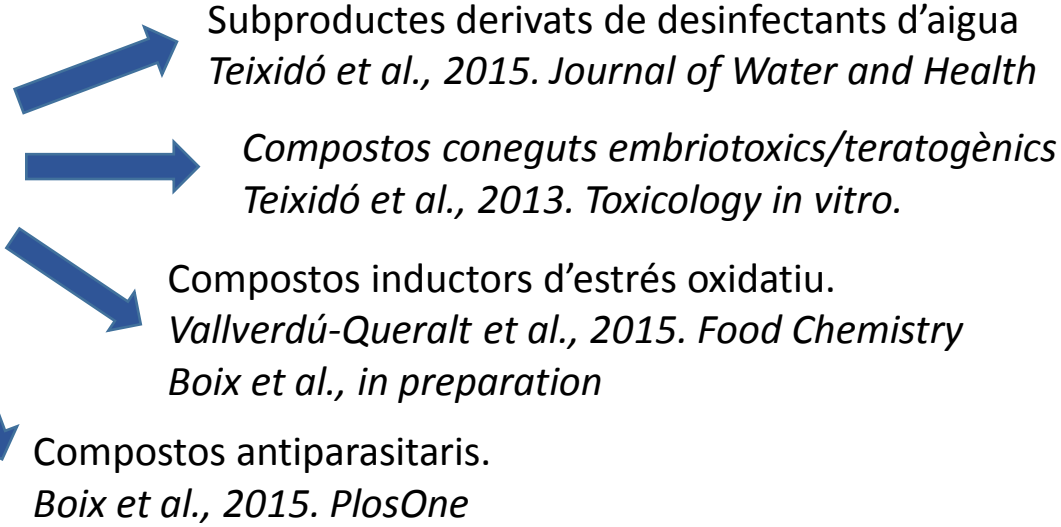
Grup de Recerca en Toxicologia



Embriotoxicitat

GRET

Grup de Recerca en Toxicologia



Publish

About

Browse

OPEN ACCESS PEER-REVIEWED

RESEARCH ARTICLE

Triclabendazole Sulfoxide Causes Stage-Dependent Embryoletality in Zebrafish and Mouse *In Vitro*

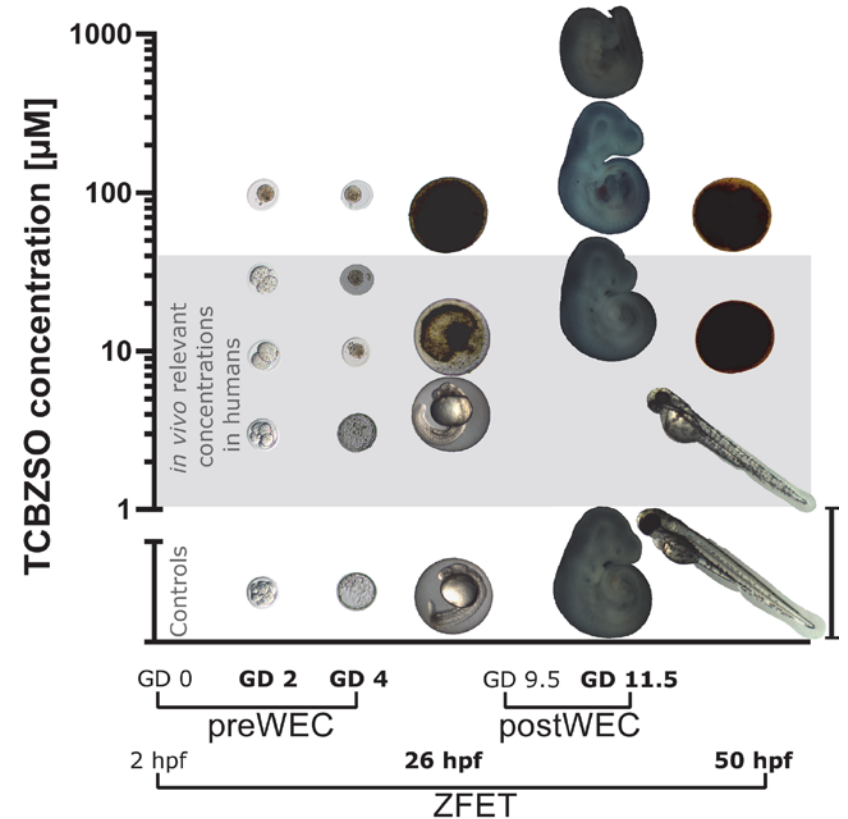
Nuria Boix, Elisabet Teixido, Marta Vila-Cejudo, Pedro Ortiz, Elena Ibáñez, Juan M. Llobet, Marta Barenys

Published: March 20, 2015 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121308>

2 compostos antiparasitaris i els seus 1^{rs} metabòlits

- Albendazol
- Triclabendazol

- Albendazol sulfòxid
- Triclabendazol sulfòxid



Inter-species comparative developmental timeline [GD/hpf]



UNIVERSITAT DE BARCELONA

GRET

Grup de Recerca en Toxicologia



Embriotoxicitat

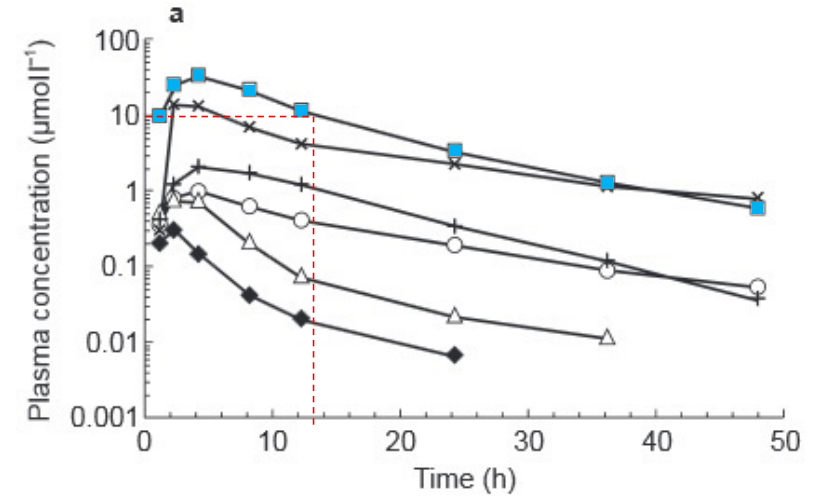
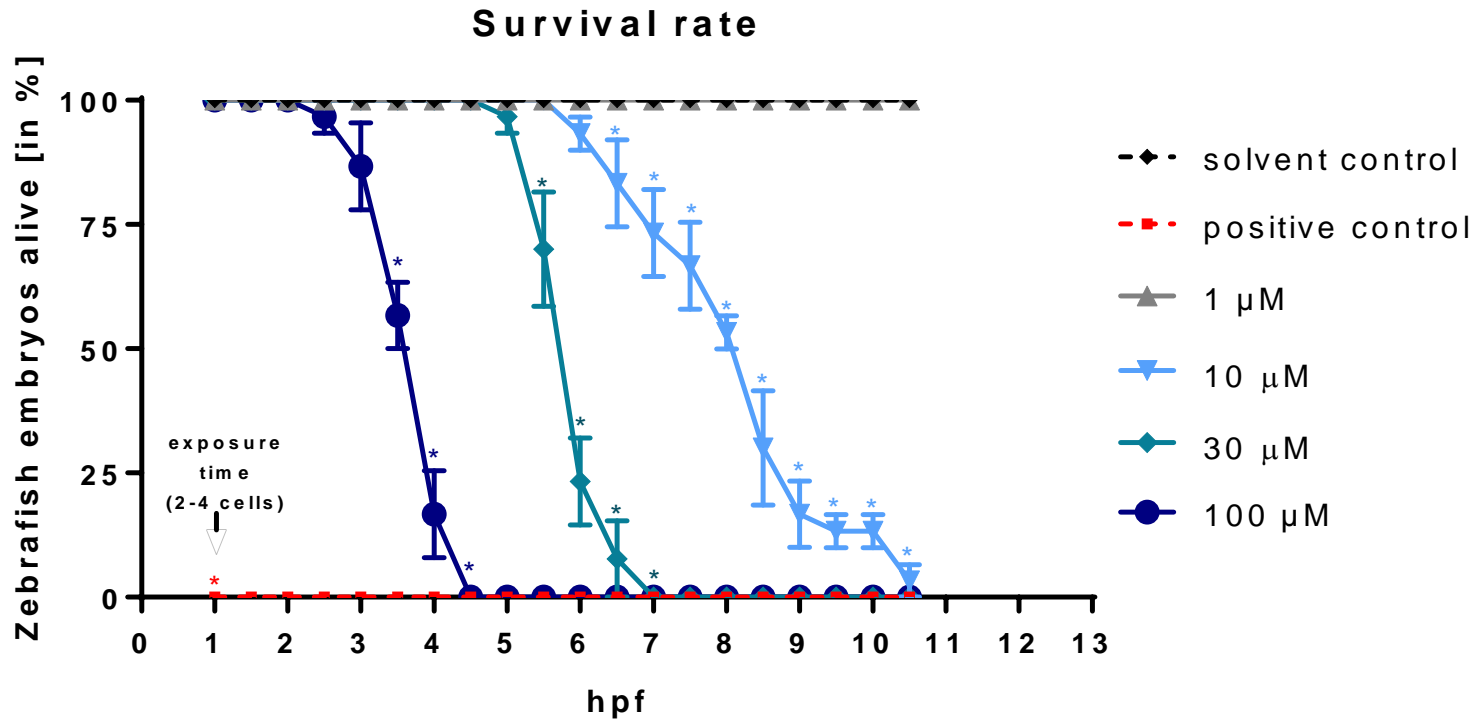


Figure 1 a) Mean ($n=20$) concentrations in plasma, log-linear scale, for TCBZ (Fasting: \blacklozenge , Fed, \triangle), TCBZ-SO (Fasting: \times , Fed: \square) and TCBZ-SO₂ (Fasting: \circ , Fed: $+$), b) AUC (0,48 h) ($\mu\text{mol l}^{-1}$) of the sulphoxide metabolite for each patient: Comparison of fasted/fed conditions. *Lecaillon et al., 1998*



Embriotoxicitat – Mecanisme?

Altres compostos de la família
Nocodazole

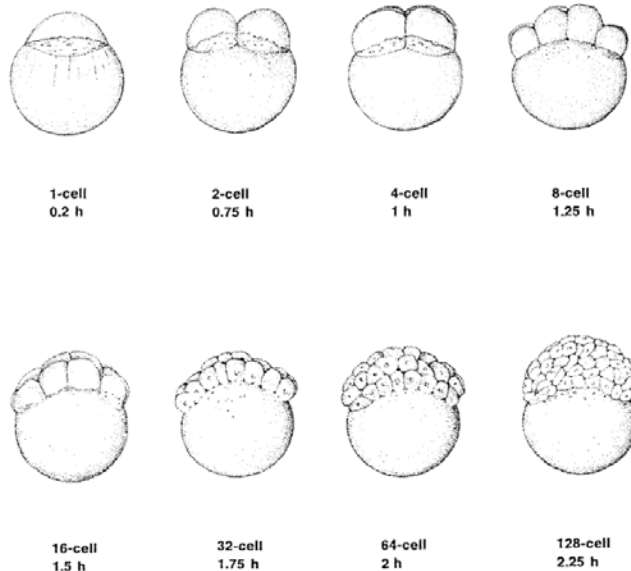
Desestabilitza microtúbuls

Atura divisió cel·lular per alteració del fus acromàtic

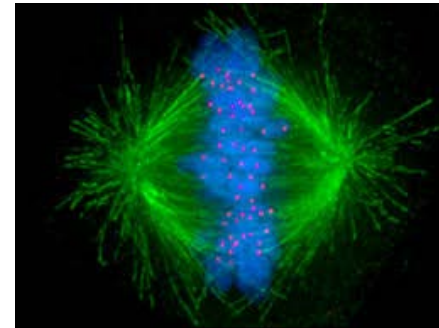
Ikegami et al. 1997

Triclabendazol sulfòxid afecta
el període de segmentació?

cleavage 0.75 – 2h

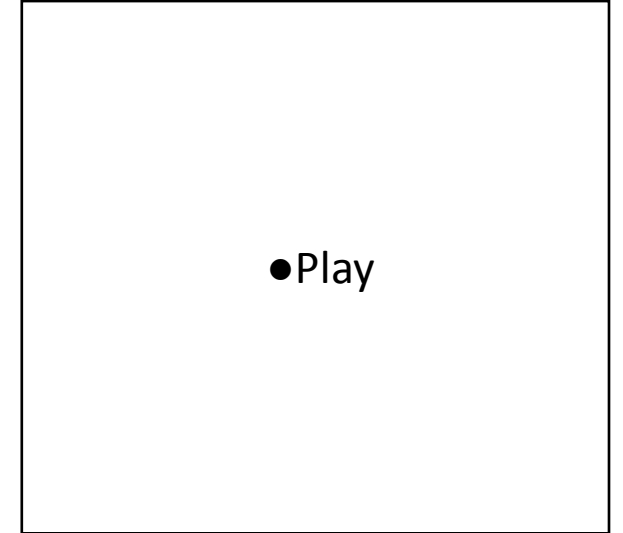


Kimmel et al., 1995

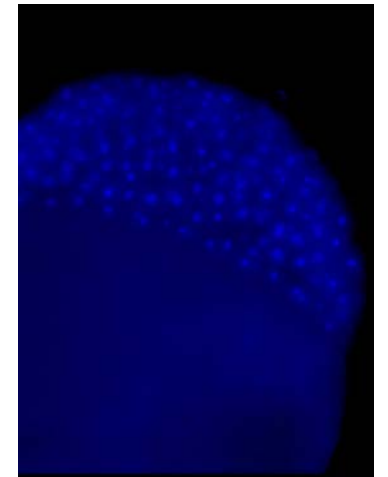


Commons.wikimedia.org

- Divisions cel·lulars ràpides:
mitosi cada 15 minuts
- Segmentació parcial o meroblàstica
vitel no es divideix



<https://www.youtube.com/watch?v=ahJjLzyioWM>



GRET. Hoechst – tinció de nuclis



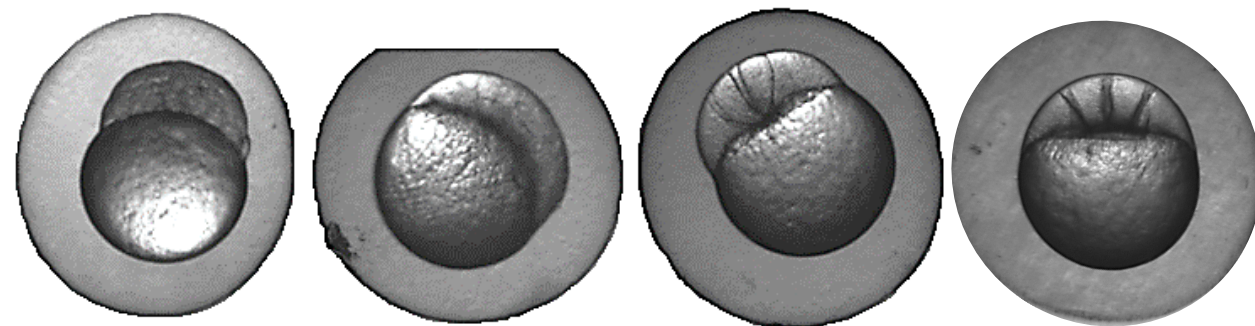
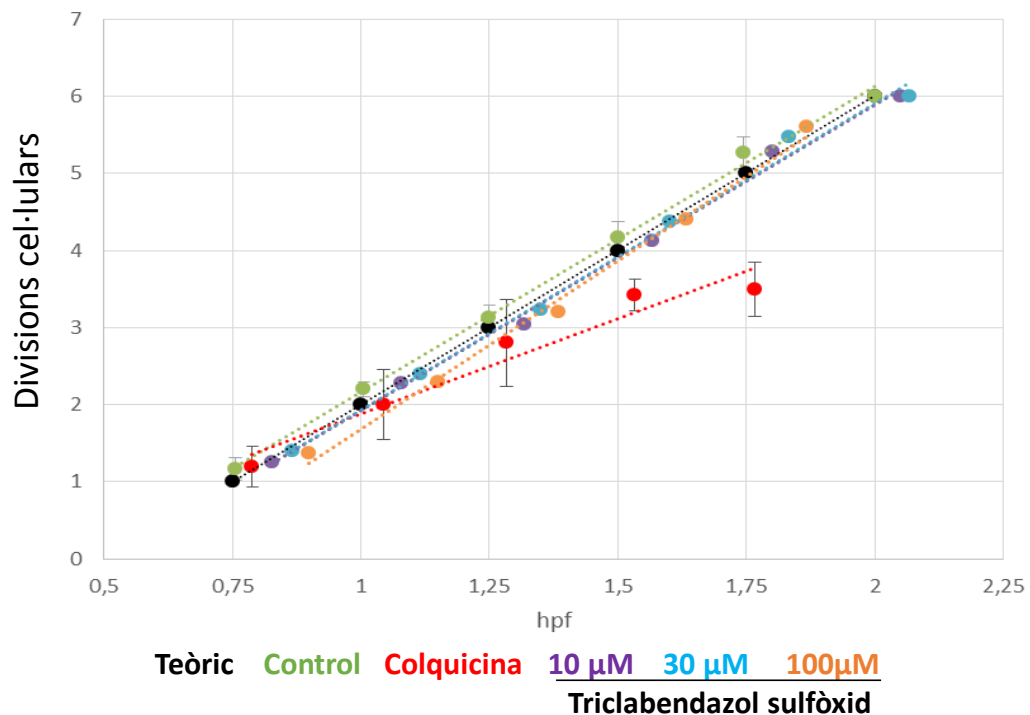
UNIVERSITAT DE
BARCELONA

GRET
Grup de Recerca
en Toxicologia



Embriotoxicitat – Mecanisme?

Cleavage period development

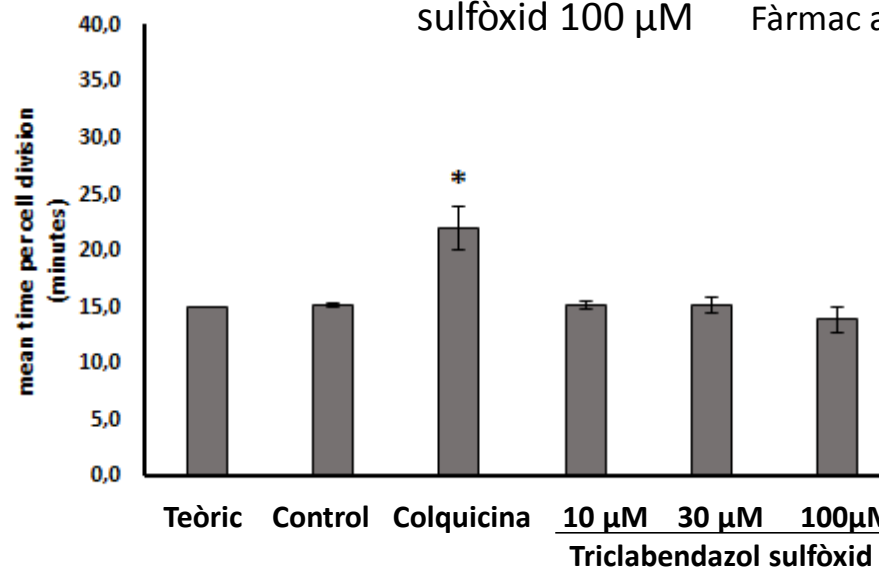


Control

Triclabendazol sulfòxid 100 µM

Colquicina Fàrmac antimitòtic

Nocodazol 0.83 µM



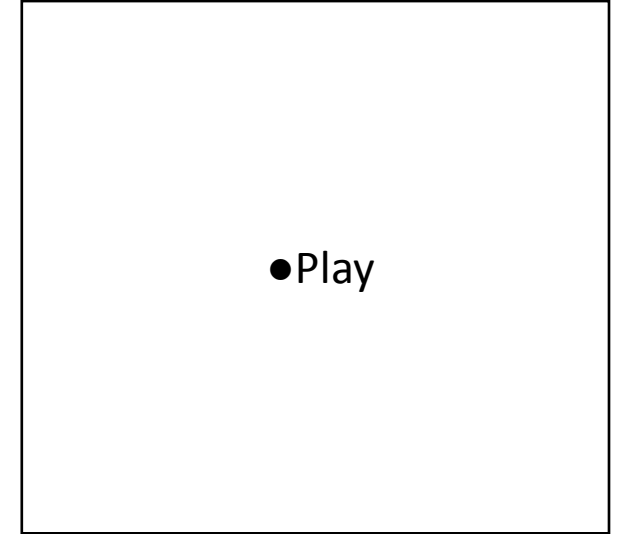


Embriotoxicitat – Mecanisme?

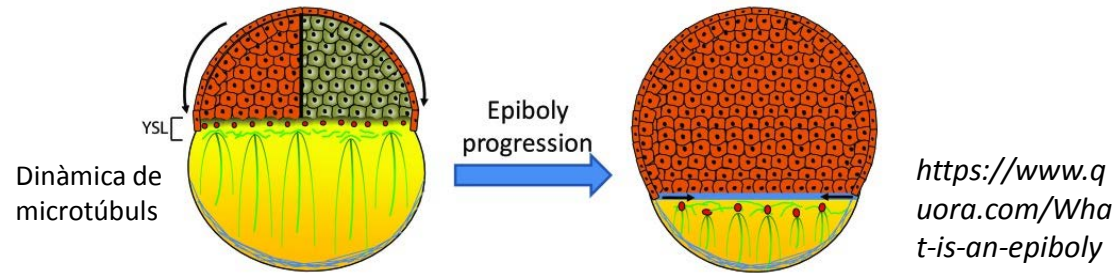
Altres compostos de la família
Nocodazole

Desestabilitza microtúbuls
Atura la progressió de l'epibòlia *Ikegami et al. 1997*

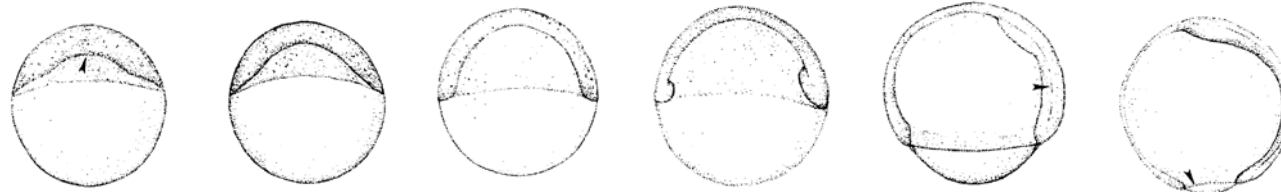
Triclabendazol sulfòxid afecta
la progressió de l'epibòlia?



<https://www.youtube.com/watch?v=ahJjLzyioWM>



Epiboly progression
4.3 – 9h



dome

30%
epiboly

50%
epiboly

shield

75%
epiboly

90%
epiboly

Kimmel et al., 1995

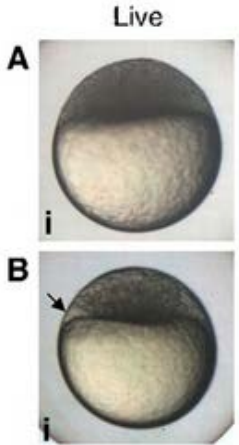
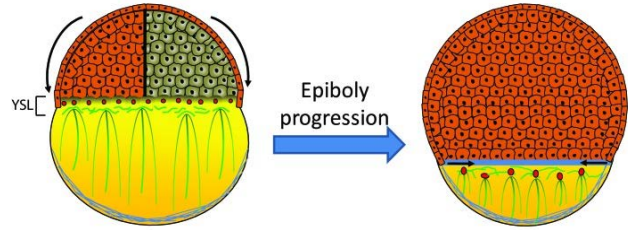


UNIVERSITAT DE
BARCELONA

GRET
Grup de Recerca
en Toxicologia



Embriotoxicitat – Mecanisme?



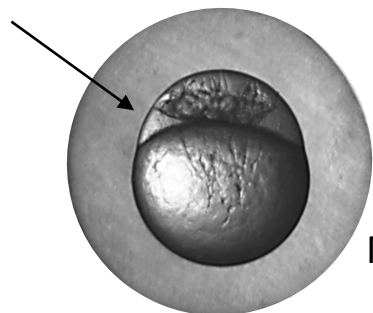
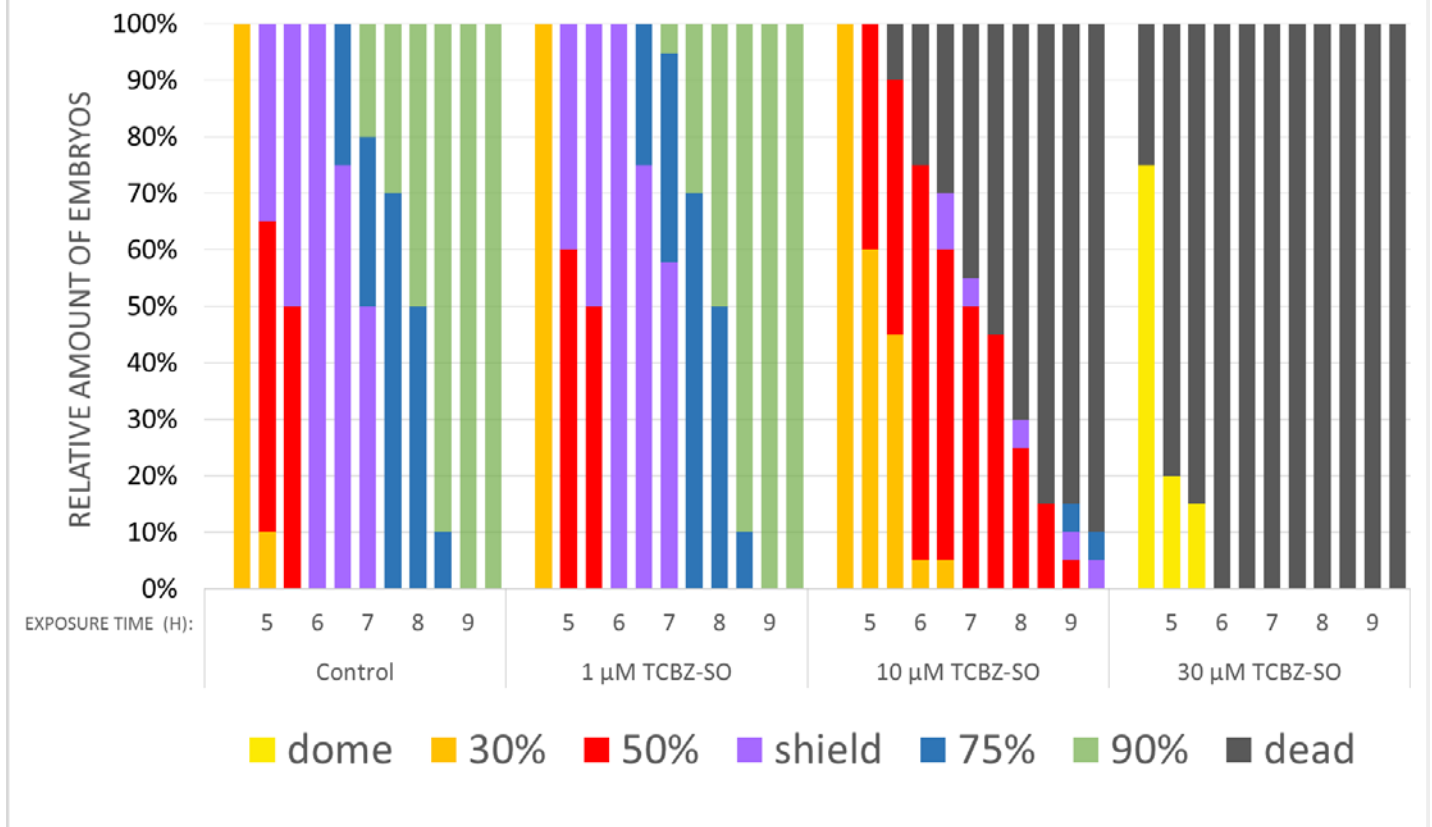
Chu et al., 2012

Strähle and Jesuthasan, 1993

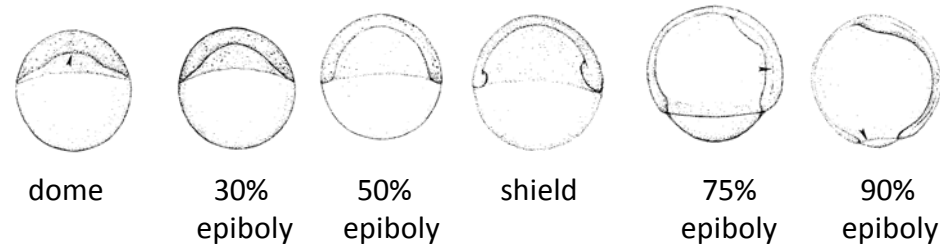
No inici/progressió de moviments epibòlia

↗ Formació sincici

Triclabendazol sulfòxid



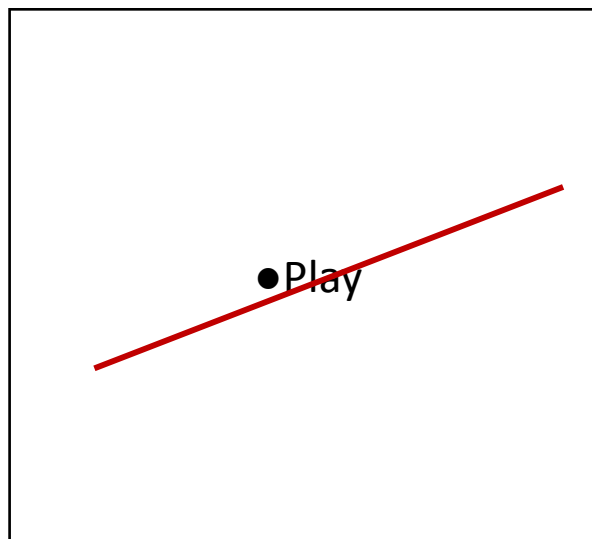
Nocodazol
0.33 µM



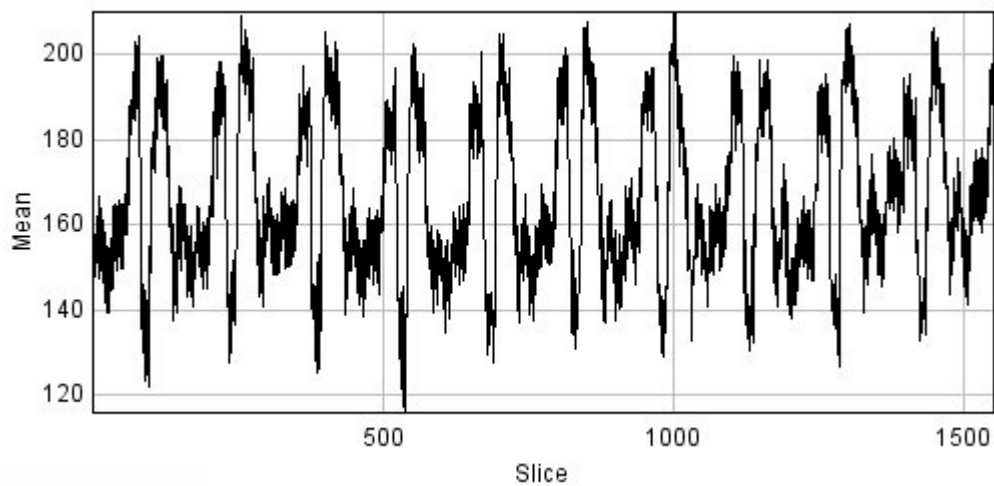
Kimmel et al., 1995



Cardiotoxicitat



400 fps



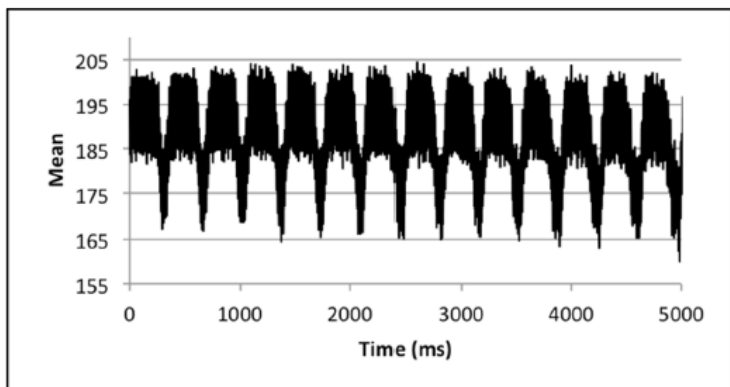
t



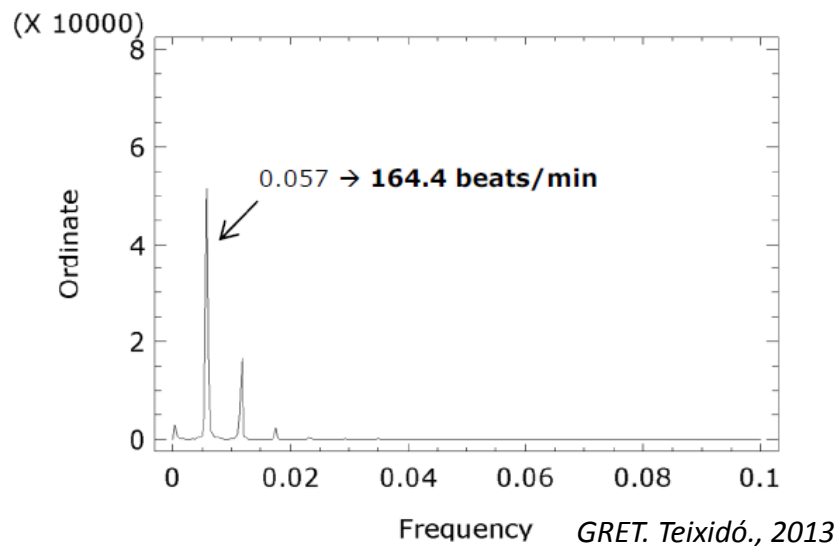


Cardiotoxicitat

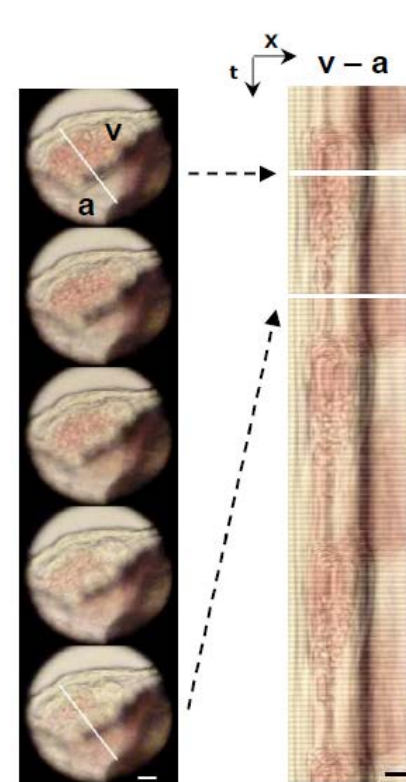
A



B

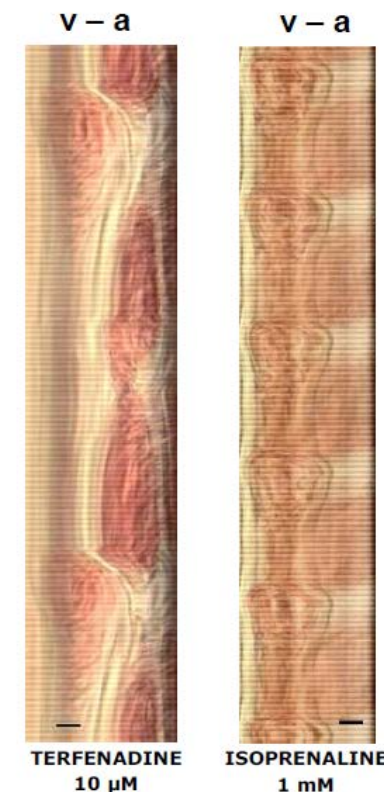


A

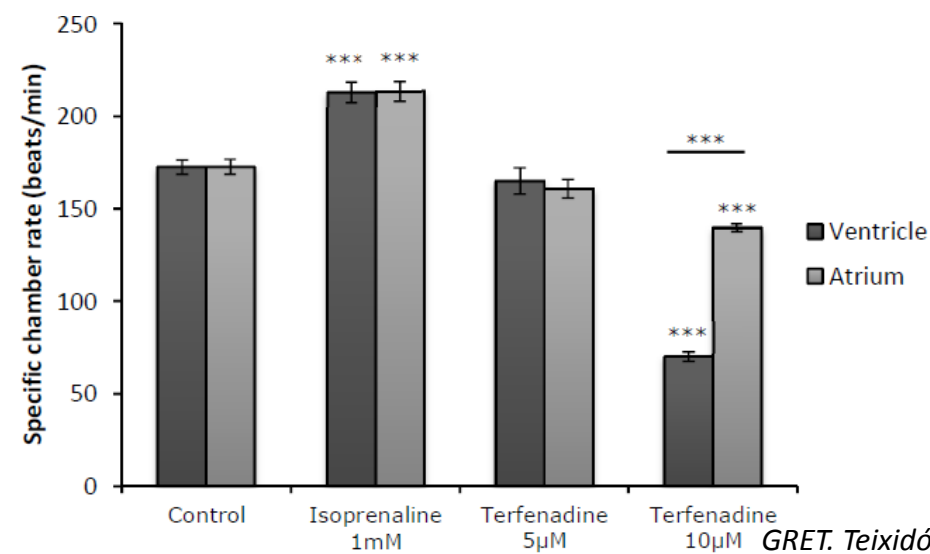


CONTROL LARVA

B



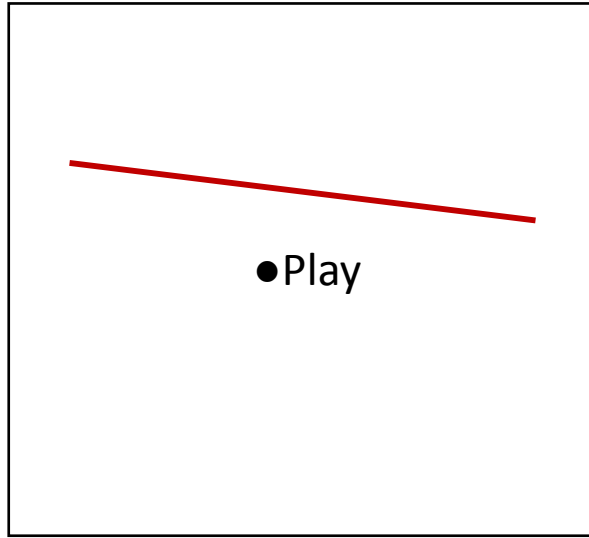
C



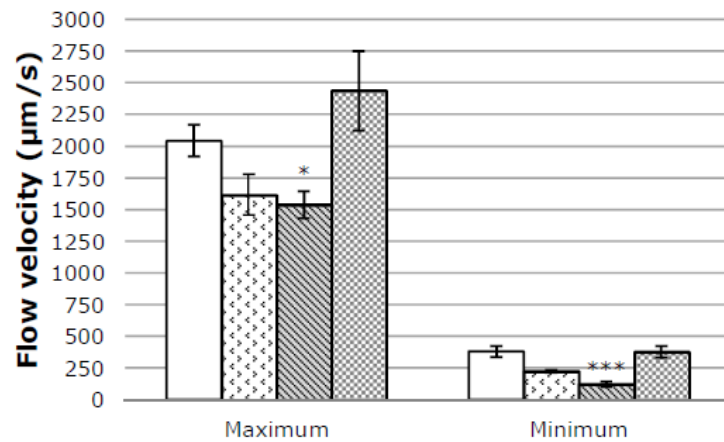


Cardiotoxicitat

t



400 fps



□ Control
▨ Terfenadine 10 µM

▤ Terfenadine 5 µM
▩ Isoprenaline 1 mM

GRET.
Teixidó., 2013



Neurotoxicitat Organisme sencer

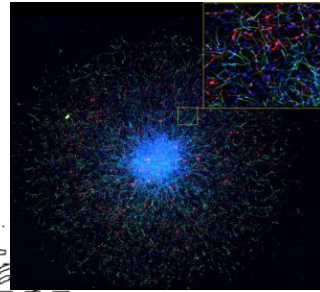
Comportament



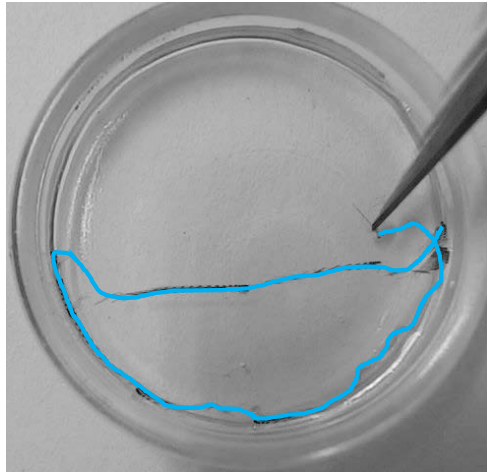
Neuroesferes

Nivell cel·lular

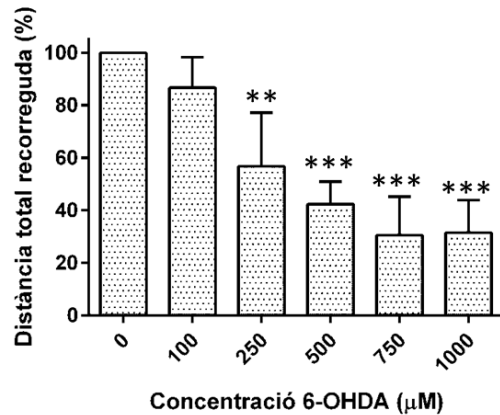
Mecanismes



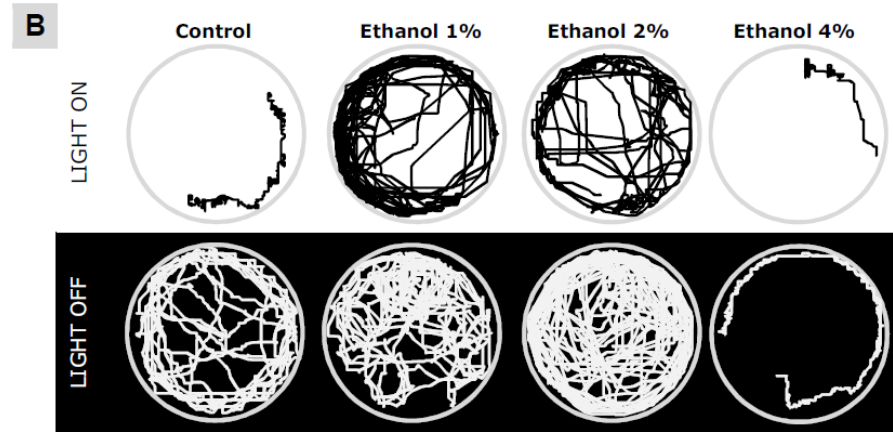
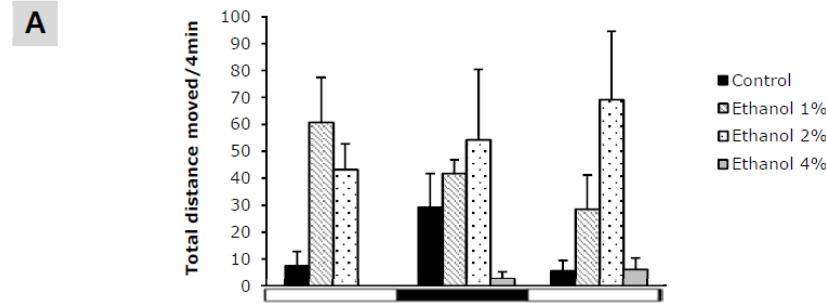
Touch-evoked response



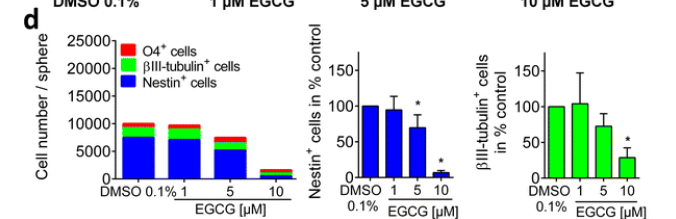
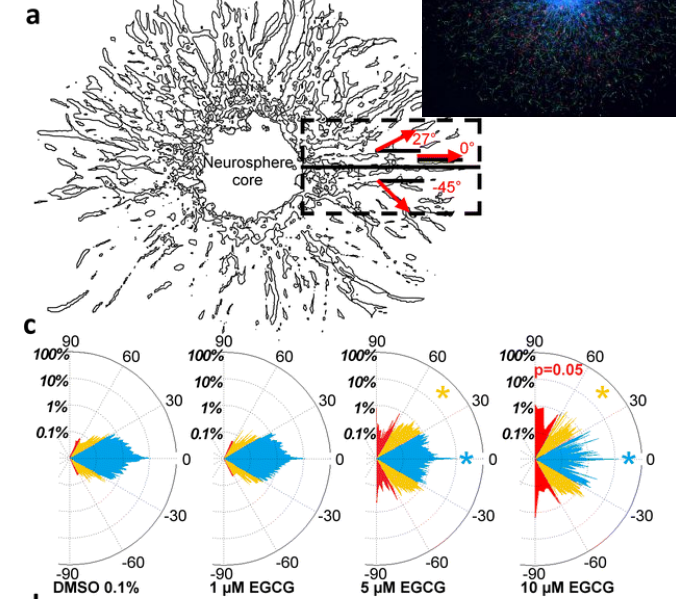
GRET. Boix., 2015



Locomotor response



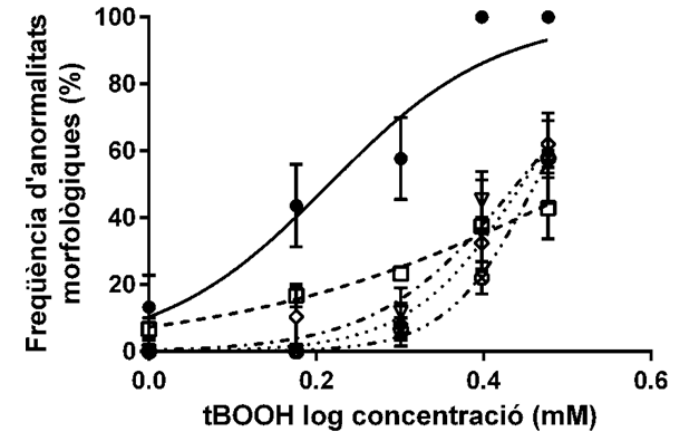
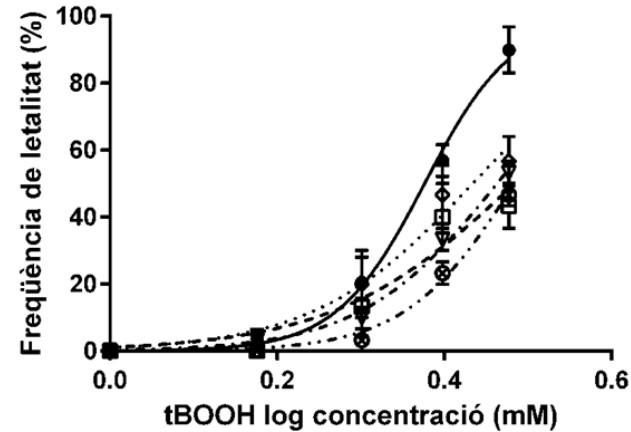
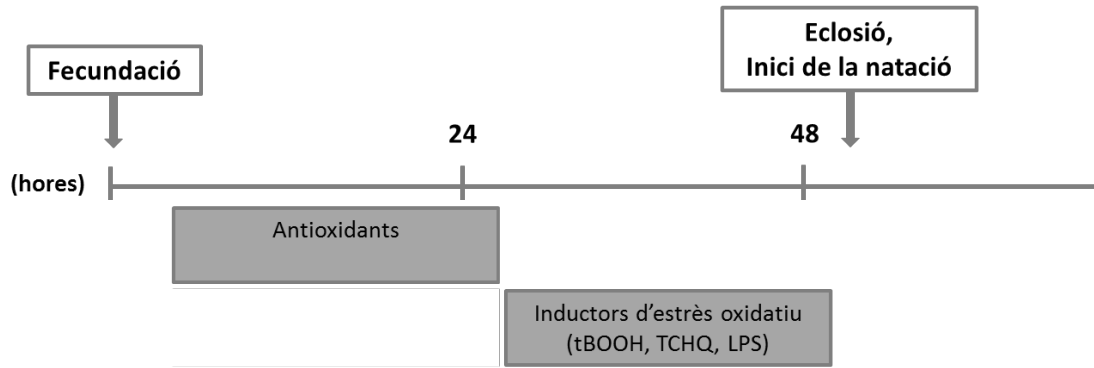
GRET. Teixidó., 2013



IUF. Barenys et al., 2017



Prevenió d'efectes tòxics



- tBOOH
- Peonidina 3-glucòsid 20µM + tBOOH
- ◇ Malvidina 3-glucòsid 20µM + tBOOH
- ▽ Quercetina 3-β-D-glucòsid 25µM + tBOOH
- Kaempferol 3-glucòsid 5µM + tBOOH

GRET. Boix., 2015

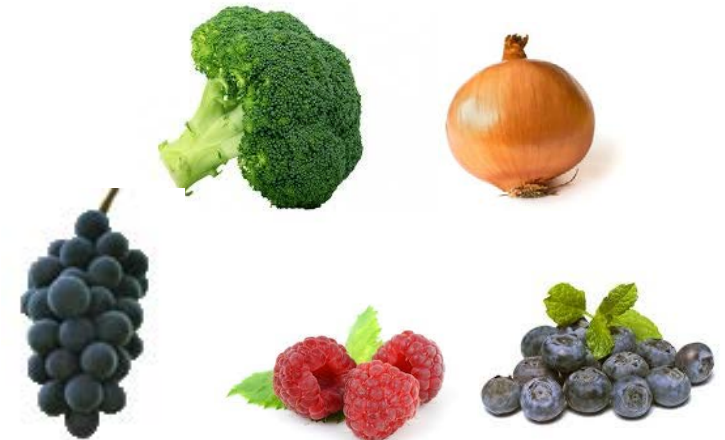


Quercetina 3-β-D-glucòsid

Malvidina 3-glucòsid

Peonidina 3-glucòsid

Kaempferol 3-glucòsid





Prevençió d'efectes inflamatoris

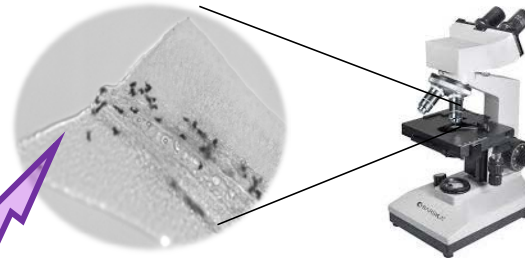


Larves de 96 hpf



Pre-exposició a compostos anti-inflamatoris 1h

Adaptació mètode Cordero et al., 2013

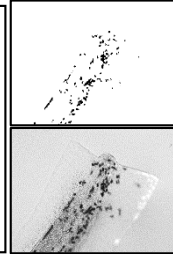


Inducció inflamació
Tall cua
+LPS *Salmonella*

Migració de neutròfils

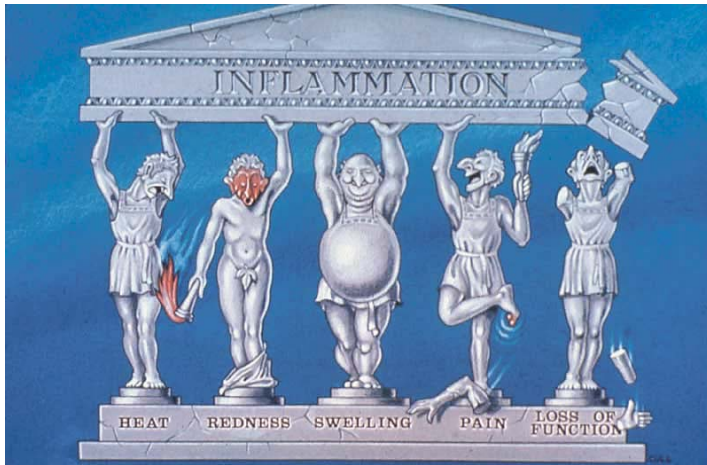
Tinció de cèl·lules
mieoloperoxidases

```
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use");
run("Z Project...", "projection=[Min Intensity]");
run("Invert");
run("Window/Level...");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
run("Apply LUT");
run("Exp");
run("Minimum...", "radius=1");
setAutoThreshold("Default dark");
//run("Threshold...");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Line Width...", "line=400");
```

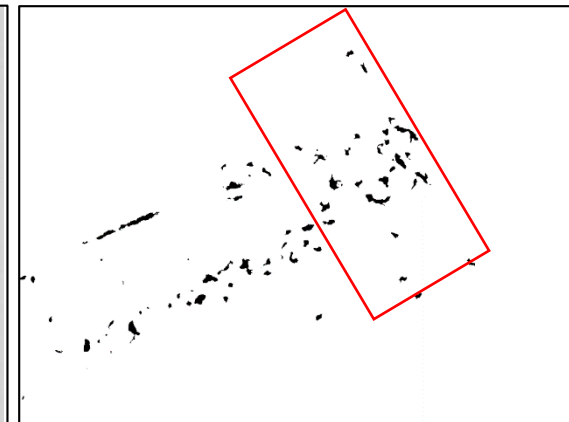
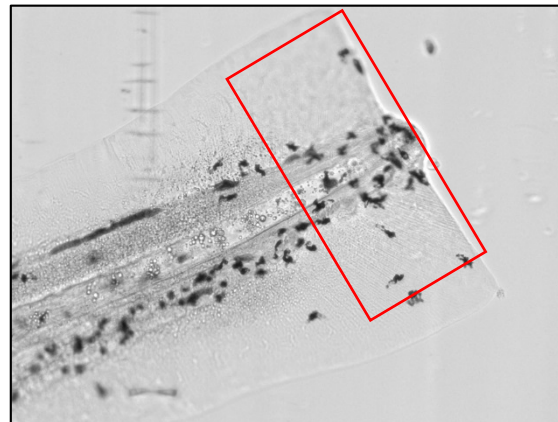


GRET. Arteaga., 2017

Análisis de Imagen
(ImageJ)



Lawrence et al., 2002



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Col·laboració Grup de Recerca
en Polifenols – Dra. Lamuela

GRET
Grup de Recerca
en Toxicologia



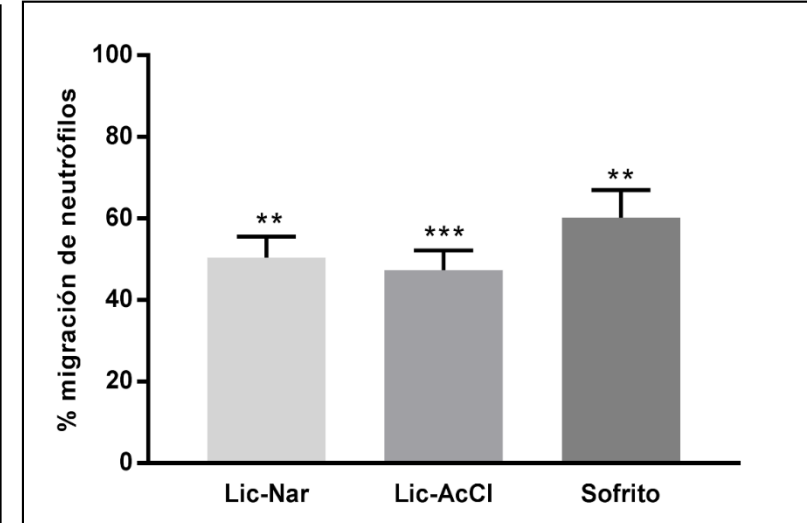
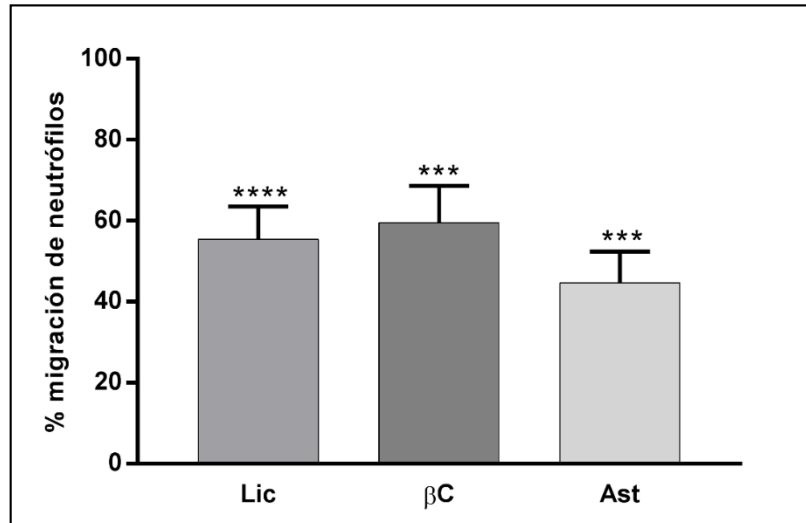
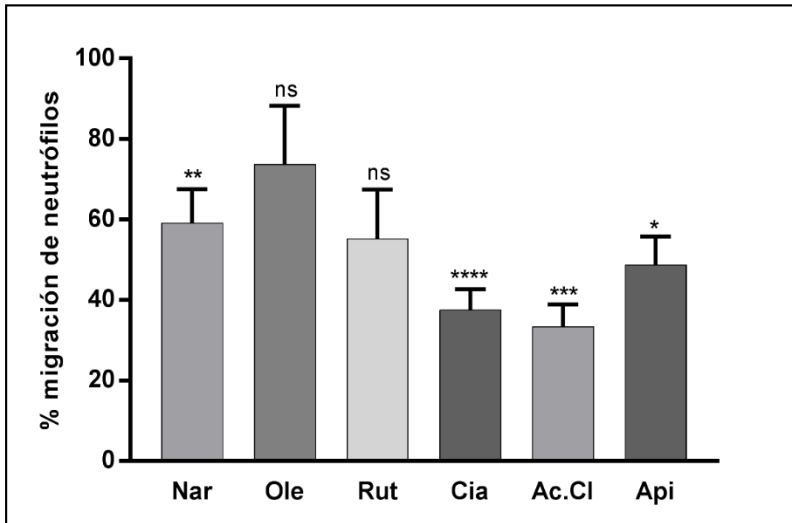
Prevençió d'efectes inflamatoris



Polifenols

Carotenoids

Combinacions



Nar (20 μM) – Naringenina
 Ole (150 μM) – Oleuropeina
 Rut (20 μM) – Rutina
 Cia (20 μM) – Cianidina
 Ac.Cl (20 μM) – Àcid clorogènic
 Api (20 μM) – Apigenina

Lic (20 μM) – Licopè
 βC (25 μM) – beta-carotè
 Ast (20 μM) – Astaxantina

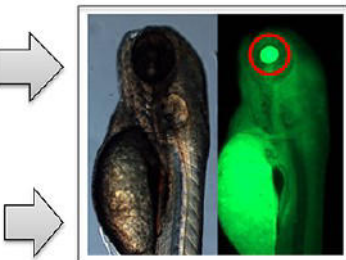
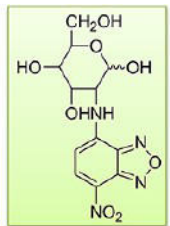
Lic-Nar (10 μM)
 Lic-Ac.Cl (10 μM)
 Sofregit (0.03 μM βC+ 0.10 Lic μM)

GRET. Arteaga., 2017

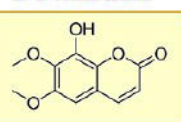




Activitat insulinomimètica



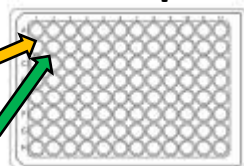
Fraxidin



Lee et al., 2013

4 larves/pou

Compost d'estudi
Glucosa fluorescent
2NBDG



1 Microscopi de fluorescència

3 Digestió – mesura fluorescència

1) Larvae preparation

Fish mating; Spawn
0.2 mM PTU treatment
Chorion removal (at 48-60hpf)

2) Sample treatment

72 hpf: place 4
larvae/well in 96 well
plate

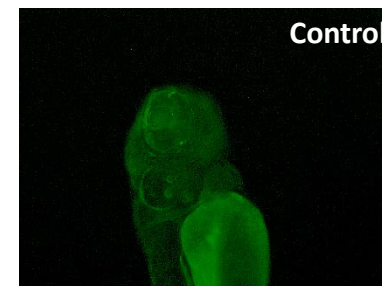
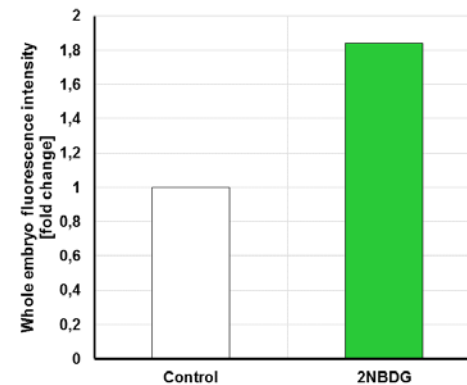
3) Add glucose probe

Water change;
600 µM 2-NBDG for 3h

4) Image analysis

Wash off 2-NBDG;
Anesthetize with tricaine;
Place in chamber slide
for imaging

Resultats preliminars



Polifenols – oli d'oliva



UNIVERSITAT DE
BARCELONA







Col·laboració Grup de
Recerca en Polifenols –
Dra. Lamuela

GRET
Grup de Recerca
en Toxicologia



Resum

El model de peix zebra ens permet avaluar *in vitro*:

-  Toxicitat aguda
-  Embriotoxicitat
-  — Cardiotoxicitat
-  — Neurotoxicitat
-  — Prevenció d'efectes adversos:
embriotoxicitat
inflamació
-  — Efectivitat de compostos insulínomimètics

Amb la finalitat de...

- Classificar les molècules segons la seva toxicitat relativa
- Seleccionar els millors candidats per a fer estudis *in vivo*
- Estudiar mecanismes de toxicitat
- Descobrir compostos presents a la dieta amb efectes protectors



GRET - Grup de Recerca en Toxicologia

Cristina Arteaga



Núria Boix



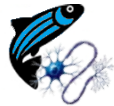
Elisabet Teixidó



Britta Kühne



Parissa Paydar



Carla Codina



Georgina Torrandell



Joan M. Llobet

Jesús Gómez

