

Trabajo de Original Toxicología Experimental

La calceína como marcador de la reserva de Ca⁺⁺ en embriones de *Danio rerio* incubados en una solución de elevada glucosa.

Álvarez M¹, Navarro E, Aurora B, Perdomo L.

Sección de Microscopia, Instituto Anatómico José Izquierdo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.

¹ Autor de correspondencia: alvarezmenator@gmail.com marco.alvarez@ucv.ve

Resumen

Haciendo uso de la Calceína como técnica complementaria para visualizar Ca^{++} por fluorescencia, se examinó la reserva de este importante ion en embriones decorionizados de *Danio rerio* de 24 hpf, incubados en una CL_{50} de 3 mmol/L de Glucosa. La reserva de Ca^{++} en los embriones control fue registrada en la región del saco vitelino a través de una intensa fluorescencia verde, con distribución homogénea y centrada. En los embriones tratados con Glucosa, la intensidad de la fluorescencia experimentó un cambio en su distribución, presentándose con una localización dispersa y asimétrica. Cuantitativamente dicho cambio se tradujo en un 40% menos en la intensa fluorescencia emitida por la Calceína, sugiriéndose un compromiso entre la reserva del Ca^{++} y la condición de un medio elevado en Glucosa. Dicho compromiso podría ser debido a una redistribución de la reserva del Ca^{++} como consecuencia de un incremento en la actividad metabólica en los embriones de pez cebra tratados con este agente metabolizante. Se pudo confirmar que el uso de una sonda fluorescente como la Calceína podría servir como una herramienta de investigación para visualizar posibles movilizaciones del Ca^{++} , en situaciones patológicas como en el caso de la hiperglicemia.

Palabras claves: Calceína, Ca^{++} , Glucosa, *Danio rerio*, pez cebra embrión decorionizado,

Summary

THE CALCEIN AS MARKER OF Ca⁺⁺ RESERVE ON *Danio rerio* EMBRYOS INCUBATED IN HIGH GLUCOSE SOLUTION.

Using Calcein as a complementary technique to visualize Ca⁺⁺ by fluorescence, the reserve of this important ion was examined in decorionized embryos of 24 hpf, incubated in Glucose LC₅₀ of 3 mmol / L. In control embryos the Ca⁺⁺ reserve was recorded in the yolk sac region through a centered, homogeneous and intense green fluorescence distribution. In the Glucose treated embryos, the intensity of the fluorescence underwent a change in its distribution, presenting itself with a dispersed and asymmetric location. This change quantitatively translated into 40% less fluorescence intense emitted by Calcein, suggesting a compromise between the Ca⁺⁺ reserve and the high condition medium Glucose. This commitment could be due to a redistribution of Ca⁺⁺ reserve as a result of an increase in metabolic activity in zebrafish embryos treated with this metabolizing agent. It was confirmed that the use of a fluorescent probe such as Calcein could serve as a research tool to visualize possible mobilization of Ca⁺⁺, in pathological situations as in the case of hyperglycemia.

Keywords: Calcein, Ca⁺⁺, Glucose, *Danio rerio*, Zebrafish decorionized embryo,

Introducción

Como es sabido, el Ca^{++} representa un elemento indispensable en la mayoría de las actividades fisiológicas de los organismos vivos¹. Particularmente, en los últimos años, el pez cebra *Danio rerio*, ha representado un poderoso modelo para estudiar los cambios metabólicos que influyen en la regulación del Ca^{++} , como en el caso de un modelo hiperglicémico.² Haciendo uso de técnicas basadas en la Fluorescencia de Calcio Green-1-dextrano y Rodamina B-isotiocianato-dextrano, ha sido comparada la actividad de este importante ion entre embriones de *Danio rerio* AB de tipo salvaje y embriones mutantes tipo hec³. Sin embargo, tratar de reproducir dichos procedimientos resulta altamente oneroso. En el presente trabajo se hizo uso de la Calceína, un cromoforo fluorescente⁴ bastante accesible en la mayoría de los laboratorios de microscopía, para examinar una posible reserva de ion Ca^{++} en etapa embrionaria temprana de *Danio rerio*, bajo una condición de hiperglicemia inducida experimentalmente por la incubación de embriones decorionizados en una solución elevada de Glucosa, a una CL_{50} de 3 mmol/L. Cabe destacar que la Calceína, también conocida como fluorexona, es un colorante fluorescente con fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{13}$, que puede considerarse un derivado del trifenilmetano y que ha sido ampliamente utilizada como un índice marcador⁵ en procesos de ingeniería del tejido óseo "in vivo". Respecto al estadio de desarrollo del pez cebra ubicado entre las 24 y 48hpf, se ha descrito una intensa actividad y control metabólico de las reservas del calcio.⁶ Algunos autores, han demostrado que los movimientos transitorios del Ca^{++} , son generados fundamentalmente en el epitelio superficial del saco vitelino⁷. Sin embargo, poco se conoce sobre qué condiciones extrínsecas o intrínsecas pudieran comprometer esta característica del estadio embrionario.

Materiales y Métodos

Embriones de *Danio rerio* decoriontizados.

Embriones de 24 hpf, obtenidos a partir de peces cebras adultos de cepa silvestre (Wnt), adquiridos en casa comercial y cultivados en el Laboratorio de Microscopia del Instituto Anatómico "José Izquierdo", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, se les fue removido el corion de forma manual, a través de estiramientos realizados con pinzas de relojero. El corion, es la envoltura que actúa como barrera de permeabilidad y que protege a los embriones en esta etapa del desarrollo⁸. Dicha remoción fue realizada para exponer a los embriones, de manera directa, a las distintas soluciones de incubación en los respectivos protocolos de experimentación.

Embriones incubados con Calceína(Cal)

La Calceína (Cal), es una sonda fluorescente que se une a iones libres como el Ca^{++} , formando quelatos que se hacen visibles a través de la emisión de fluorescencia verde obtenida por excitación a longitud de onda de 495 nm. Los embriones de pez cebra desprovistos del corion, fueron sumergidos en una solución de Cal de 1% Sigma-Aldrich, C0875, Missouri, MO, EEUU, durante 10 minutos. Luego fueron lavados varias veces con agua de pecera para eliminar la cantidad del colorante no fijado. El uso de esta sonda "in vivo" podría estar actuando como un indicador positivo celular, permitiendo la recolección de datos relacionados con el control de calidad para la viabilidad tisular y la mortalidad celular del tejido epitelial de la región vitelina.

Embriones incubados en solución de Glucosa (Glu)

Experimentos previos realizados en el laboratorio para la estandarización del modelo larvario de hiperglicemia, han permitido establecer, en larvas de 5 dpf, una concentración letal cincuenta de Glucosa (Glu-CL₅₀), de 3 mmol/L. Esta concentración ha sido seleccionada para analizar su vinculación con la posible reserva de Ca^{++} embrionario. Los embriones fueron incubados en dicha concentración durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo con Glu, las muestras controles y tratadas fueron incubadas

durante 10 min en oscuridad, en la solución de Cal, previamente descrita. Ambos grupos (Caly Glu-Cal), fueron observados bajo el Microscopio de Fluorescencia Olympus IX71.

Análisis de Imágenes

Las señales fluorescentes de ambas muestras, fueron registradas a través de tomas fotográficas realizadas sobre el área del epitelio superficial del saco vitelino de los embriones controles y tratadas (Cal y Glu-Cal). Dichas tomas fueron realizadas a igual plano focal y en un aumento de 10x en un microscopio de fluorescencia Olympus IX71, con irradiación FITC λ_{exc} 475-500 nm, excitación y emisión respectivamente. Los resultados fueron obtenidos a partir de los análisis de imágenes realizados sobre las diferentes fotografías y cuantitativamente expresados en histogramas de densidad obtenidos a través los programas DP Manager y Programa ImageJ.

Resultados

El decorionizado manual de los embriones de 24 hpf, permitió exponerlos de manera directa a la solución Calceína y observarlos bajo iluminación episcópica. En el grupo control (Fig.1), fue posible visualizar un buen desarrollo del notocordio (flecha), una clara porción cefálica (doble flecha) y el evidente saco vitelino (asterisco), en el cual destaco una densa zona oscura color café (Fig.1.doble asterisco), que al ser sometida a iluminación FITC λ_{exc} 475-500 nm (Fig.1a), mostró correspondencia con una zona de intensa fluorescencia verde, de mayor intensidad a nivel central (flecha) y un área periférica vesicular (doble flecha). El análisis de contraste de imagen (Fig.1a'), ratifico la correlación entre la zona densa café y la densa fluorescencia verde así como la densidad del marcaje representada en un histograma de densidad (Fig.3a). De igual manera los embriones decorionizados tratados con Glucosa (Fig.2.Glu-3mmol/), e incubados con la solución Calceína mostraron un buen desarrollo del notocordio (flecha), una clara porción cefálica (doble flecha) y el evidente saco vitelino. Sin embargo, bajo iluminación episcópica no se destacó la densa zona oscura color café (doble asterisco). Al ser observados bajo iluminación FITC λ_{exc} 475-500 nm, (Fig.2a), se pudo observar una zona de

fluorescencia verde dispersa (doble cabeza de flecha) y vesicular (cabeza de flecha), ubicada en toda el área vitelina. El análisis de contraste de la imagen (Fig.2a'), ratifico la zona de fluorescencia verde dispersa cuantificada en el histograma de densidad (Fig.3b), a través del cual se pudo cuantificar una reducción del 40% de la fluorescencia verde en la región vitelina.

Discusión

La diversidad de colorantes vitales disponibles que permiten, individualmente o combinados, el análisis microscópico de múltiples parámetros celulares y subcelulares, ha hecho de las sondas fluorescentes una estrategia versátil y eficiente para los estudios "in vivo" e "in vitro" de la morfo-funcionalidad tisular y celular⁹. Cabe destacar que la aplicación de una sonda fluorescente como la Calceína permitió por una parte, hacer visible la reserva de Ca^{++} en el área vitelina de embriones de pez cebra de 24 hpf, y por otra parte, demostrar que dicha reserva se ve comprometida al someter a la población embrionaria a un medio de elevada concentración de Glucosa. En cuanto a la existencia de la reserva de Ca^{++} , cabe destacar que estos resultados recuerdan los obtenidos por otros autores, quienes a través de métodos más sofisticados de mayor resolución, han descrito la reservas de Ca^{++} como una zona de "especificación regional" del Ca^{++} que regula una serie de eventos básicos del desarrollo durante el estadio de blástula en el pez cebra¹⁰. Sí está "especificación regional" del Ca^{++} , pudiera corresponder a la visibilizada por la Calceína en la presente investigación, no podemos concluirlo. Sin embargo, fue evidente una regionalización del Ca^{++} obtenida con el uso de la Calceína. Por otra parte, el compromiso de esta reserva de Ca^{++} ante una condición de elevada Glucosa, también concuerda lo planteado por otros autores, quienes a través de la medición de algunos intermediarios metabólicos describen la movilización de reservas de Ca^{++} . Así, cambios en el fosfatil inositol, comprometen la movilización del Ca^{++} , en un modelo embrionario de pez cebra¹¹. Dicho compromiso ha sido definido como un evento de centralización-descentralización ventralizante de señalizaciones de Ca^{++} . Por otra parte el complejo

calcio-fosforo¹², ha sido asociado con el desarrollo de calcificaciones vasculares en la denominada Diabetes Mellitus. Sí algunos de estos metabolitos se encuentran presentes en la condición de elevada concentración de Glucosa estudiada, habría que demostrarlo en futuras investigaciones. Sin embargo, resulto evidente que la condición del medio hiperglicémico utilizado en la presente investigación, promovió cambios significativos en la reserva del Ca⁺⁺ de los embriones tratados. Estos hallazgos experimentales han permitido concluir que en un daño hiperglicémico durante periodos tempranos del desarrollo, comprometería alguna reserva de este importante ion Ca⁺⁺, como ha sido sugerido en la presente investigación.

Fig.1. Reserva de Ca^{++} en larvas de *Danio rerio* 24 hpf (Control). Se resalta región vitelina (*), la región cefálica (doble-flecha), región caudal (flecha). (Fig.1a), larvas incubadas en solución de Calceína y observadas con $FITC_{\lambda.exc\ 475-500\ nm}$. El análisis de contraste (Fig.1a'), destaca región densa (flecha) y área celular en la periferia (doble-flecha) Microscopio de Fluorescencia Olympus IX71. Objetivo 10X. Barra=250 μ m.

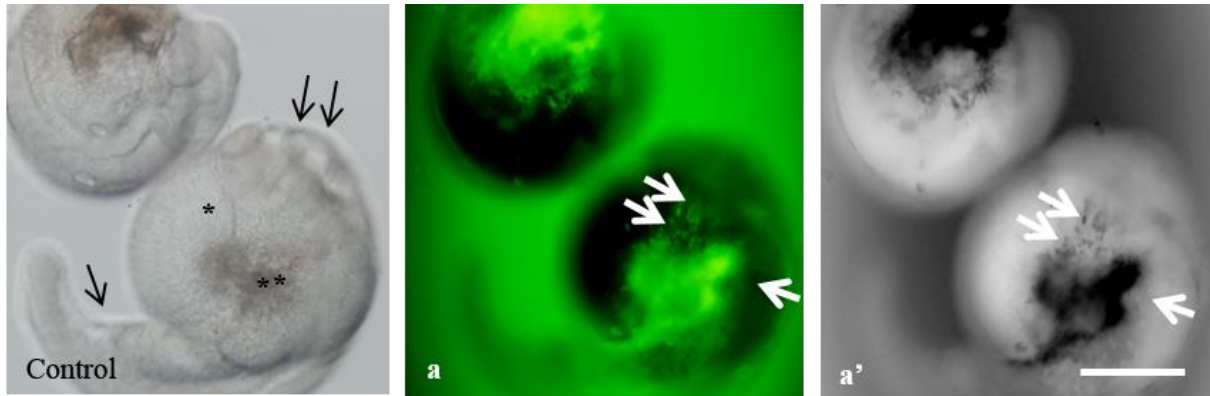


Fig.2. Movimiento de la reserva de Ca^{++} en larvas de *Danio rerio* 24 hpf, tratadas con Glucosa 3 mmol/L. Se resalta región vitelina (*), la región cefálica (doble-flecha), región caudal notocorda (flecha). (Fig.2b), larvas tratadas, incubadas en solución de Calceína y observadas con $FITC_{\lambda.exc\ 475-500\ nm}$. El análisis de contraste (Fig.2b'), destaca dispersión de la región densa (cabeza de flechas) y del área celular (doble-cabezas de flecha). Microscopio de Fluorescencia Olympus IX71. Objetivo 10X. Barra=250 μ m.

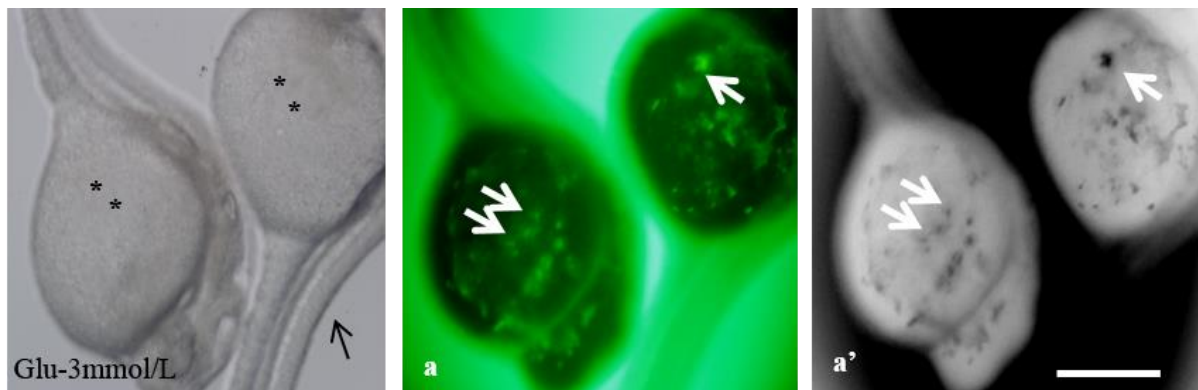
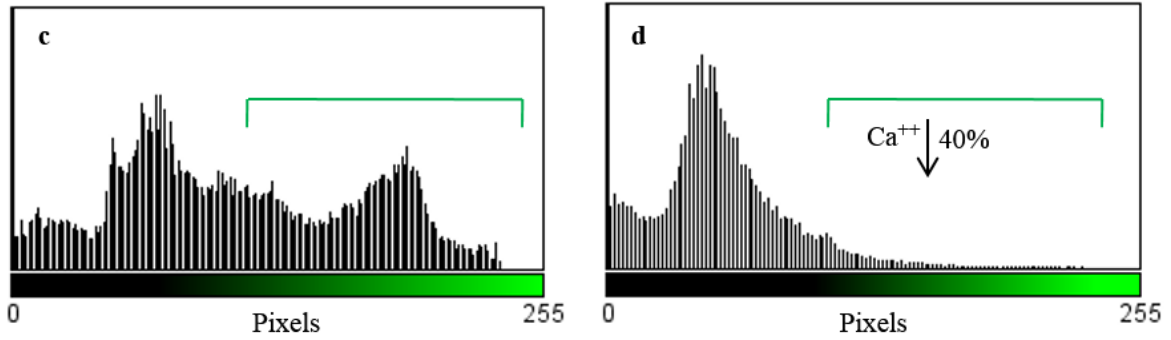


Fig.3. Histogramas de densidad. Control: Calceína (Fig.3a). Tratado: Glu-Cal (Fig.3b). Se destaca la reducción del 40% de la fluorescencia verde. Análisis de Imágenes. Programa DP Manager y Programa ImageJ. Microscopio de Fluorescencia Olympus IX71. Objetivo 10X. Control n=10 tratado n=7. Acumulación de luminiscencia que cubre el área total de la región vitelina en 255 píxeles.



Bibliografía

1. WB Cannon. Organization for physiological homeostasis. *Physiological reviews*. 1929. Vol IX (3); 1-33.
2. Capiotti KM, Antonioli R Jr, Kist LW, Bogo MR, Bonan CD, Da Silva RS. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2014 May; 171:58-65
3. Munić V, Hlevnjak M, Eraković Haber V. Characterization of rhodamine-123, calcein and 5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDCF) export via MRP2 (ABCC2) in MES-SA and A549 cells. *Eur J Pharm Sci*. 2011 Aug 17; 43(5):359-369.
4. Du SJ, Frenkel V, Kindschi G, Zohar Y. Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein. *Dev. Biol*. 2001 Oct 15; 238 (2):239-46.
5. Van Gaalen SM, Kruyt MC, Geuze RE, de Bruijn JD, Alblas J, Dhert WJ. Use of fluorochrome labels in "in vivo" bone tissue engineering research. *Tissue Eng. Part B Rev*. 2010 Apr; 16(2):209-17.
6. Lin CH, Hwang PP. The Control of Calcium Metabolism in Zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Sci*. 2016 Oct 26; 17(11), 2-16.
7. Ma LH, Webb SE, Chan CM, Zhang J, Miller A. Establishment of a transitory dorsal-biased window of localized Ca²⁺ signaling in the superficial epithelium following the mid-blastula transition in zebrafish embryos. *Dev. Biol*. 2009 Mar 1; 327(1):143-57.
8. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn*. 1995 Jul; 203(3):253-310.
9. Yang F, Gao H, Li SS, An RB, Sun XY, Kang B, Xu JJ, Chen HY. A fluorescent τ -probe: quantitative imaging of ultra-trace endogenous hydrogen polysulfide in cells and in vivo. *Chem Sci*. 2018 May 29; 9(25):5556-5563.
10. Yuen MY, Webb SE, Chan CM, Thisse B, Thisse C, Miller AL. Characterization of Ca(2+) signaling in the external yolk syncytial layer during the late blastula and early

gastrula periods of zebrafish development. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jul; 1833(7):1641-56.

11. Westfall TA, Hjertos B, Slusarski DC. Requirement for intracellular calcium modulation in zebrafish dorsal-ventral patterning. *Dev. Biol.* 2003 Jul 15; 259(2):380-91.

12. Costa JM, Sartori MMP, Nascimento NFD, Kadri SM, Ribolla PEM, Pinhal D, Pezzato LE. Inadequate Dietary Phosphorus Levels Cause Skeletal Anomalies and Alter Osteocalcin Gene Expression in Zebrafish. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 25; 19(2), 2-13.

Recibido: 11/09/18

Aceptado: 11/09/18