



ESTUDI DE L'EXPOSICIÓ A L'ALCOHOL EN EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI

El Peix Zebra com a Model Animal

Oriol Capell Sandin
Escola Gravi

Tutors: Marta Moles i David Mengual

ÍNDEX

0.Resum	3
1.Introducció	3
1.1.Experiència personal	5
1.2.Peix Zebra	6
1.3.Estudi del model animal	7
1.3.1.Dimorfisme sexual	8
1.3.1.Cicle biològics	9
1.4.SAF	12
2.Hipòtesi i Objectius	14
3.Materials i Mètodes	14
3.1.Materials	14
3.2.Mètodes	15
4.Resultats	21
4.1.Neurotoxicitat. Locomoció	21
4.2.Hepatotoxicitat	22
4.2.1.Hepatomegàlia	22
4.2.2.Esteatosi i Yolk lipid	23
4.3.Taula de Resultats	24
5.Discussió	25
6.Conclusions	26
7.Ètica	27
8.Bibliografia i Webgrafia	29
9.Conclusions del Treball i Agraïments	30

0.Resum

El consum maternal d'alcohol pot provocar l'aparició de Trastorns de l'Espectre Alcohòlic Fetal (FADS, sigles de l'anglès), aquests comporten diversos problemes irreversibles pel nou-nat, com retràs mental, discapacitats físiques i trastorns en el comportament social. Aquest fet genera un problema públic de salut, és per això que s'inverteix en recerca per trobar un possible tractament. A causa de les seves característiques el peix zebra ha resultat un model molt útil per estudiar aquest tòxic, en conseqüència en aquest treball s'ha analitzat els desordres que genera l'alcohol a l'embrió del peix, concretament en l'afectació al fetge i al sistema nerviós, mitjançant una prova de locomoció i dues per a l'anàlisi del fetge i els trastorns desenvolupats, les quals han demostrat que l'etanol resulta tòxic per al desenvolupament embrionari.

1.Introducció

En l'actualitat un dels grans problemes de la societat, és l'ús recreatiu de drogues, el consum d'aquestes pot degenerar en problemes greus per la salut humana. En Concret el tòxic més acceptat és l'alcohol, a Catalunya l'edat mitjana pel primer contacte amb la droga és només a 13,9 anys, el 60% dels individus entre 15-64 anys manifesten haver begut alcohol en l'últim mes i el 9,8% ho fan de manera diària.

L'Organització Mundial de la Salut (OMS), defineix l'alcoholisme com una malaltia caracteritzada per la ingesta excessiva i freqüent de begudes alcohòliques les quals el seu consum pot originar fenòmens de tolerància i dependència que ocasionen en l'individu danys físics, neurològics i socials. Tant és així que la UE atribueix al consum d'alcohol un cost estimant de 155.800 milions d'euros anuals destinats a diferents aspectes: productivitat, sanitat, justícia i serveis socials, a més de possibles afectacions a tercers, per tant, és un problema de salut pública. Quan aquest tòxic es veu present durant l'embaràs, la molècula travessa fàcilment la placenta i en conseqüència pot causar danys a l'embrió. No obstant no hi ha un volum d'etanol determinat el qual provoqui un risc, però si se sap que

com més gran sigui el consum més grans són les dificultats. En arribar la droga a l'embrió, aquest pot desenvolupar una sèrie de discapacitats cognitives, físiques i d'altres associades al comportament, conegudes com a trastorns de l'espectre alcohòlic fetal (FADS), com a forma més crítica es troba la síndrome alcohòlica fetal (SAF).

La síndrome alcohòlica fetal (SAF) és una malaltia que causa endarreriment mental, problemes orgànics, neurològics i psicològics. Per detectar-la s'analitzen unes certes característiques: endarreriment en el creixement i en la psicomotricitat, pont nasal Baix, microcefàlia, etc. Tot i que és una malaltia important, no es troben gran quantitat d'estudis que quantifiquin el nombre d'afectats, però es calcula que a Espanya 2 de cada 1000 infants poden presentar-la. El dany cerebral provocat per l'etanol és irreversible, és per això que s'inverteix en recerca per trobar un possible tractament per millorar les condicions dels individus que la presenten.

Les investigacions que es centren en desenvolupar nous productes sanitaris estan dins de la branca de la biomedicina. Els laboratoris que duen a terme aquests estudis, necessiten un model per testar les diferents hipòtesis. Un model pot ser de diferents tipus, in-vitro on els tractaments s'apliquen directament a cèl·lules o teixits aïllats de qualsevol organisme, in-silico sent aquest el més modern, ja que la recerca es produeix mitjançant un ordinador amb un software determinat i per últim in vivo on s'utilitza un animal.

Quan es pensa en models animals, la majoria de persones se'ls ve al cap la imatge d'un ratolí el qual experimenten amb ell, però, no només es treballa amb aquests, en recerca s'observa una gran diversitat de models com per exemple: mosques de la fruita (*Drosophila melanogaster*), granotes (*Xenopus laevis*), llevats (*Saccharomyces cerevisiae*) i molts més. Cadascun dels organismes té unes característiques que els fan útils en diferents camps de la investigació biomèdica. Entre els models que es fan servir actualment es pot destacar un en especial, que en els últims anys s'ha popularitzat molt, aquest és el peix zebra (*Danio rerio*), l'ús més gran d'aquesta espècie es veu degut pel fet que té moltes característiques que la fan molt ajustada per a un laboratori, ja que, té una fàcil mantenció i manipulació, també es reproduïx amb molta facilitat (per cada posta tenim una mitja d'uns 200-300 ous) i el seu desenvolupament és molt ràpid, en tres mesos de vida, un individu és adult i sexualment madur, d'altra banda és

un animal molt desenvolupat evolutivament amb una alta complexitat i comparteix un 80% del seu genoma amb l'ésser humà, per altra banda la gran majoria de laboratoris que fan estudis amb aquest peix ho fan només en l'estadi de larves, ja que, per treballar amb adults s'ha de tenir un permís i una titulació especial. Gràcies a aquests avantatges el peix zebra ha esdevingut perfecte per a l'experimentació amb diferents tipus de molècules que són aplicades directament al seu medi, i és per aquest motiu que ha estat escollit per dur a terme aquest treball.

1.1.Experiència personal

A l'hora de començar el treball de recerca et trobes davant d'infinites possibilitats les quals no et generen gens d'interès, fins que arribes a un tema que et motiva i un seguit d'idees sorgeixen fluidament per assolir el resultat desitjat.

Tenia clar que em decantaria per la branca de les ciències de la salut i biologia, després d'un seguit de possibles treballs no viables o massa pobres, vaig aconseguir una cita per parlar amb l'Ignasi Shaun el qual és un dels fundadors de Zeclinics una empresa la qual treballa amb laboratoris que usen el peix zebra com a model animal, bàsicament era per valorar les diferents propostes que jo tenia i si hi podia haver una part experimental clara i realitzable, poc després em va explicar el funcionament del laboratori i em va animar a buscar informació sobre el peix zebra i les seves opcions en recerca biomèdica. L'endemà i després de buscar informació ja tenia el meu tema principal, el peix zebra. Gràcies a la seva recent popularització, volia fer un estudi de per què és el més utilitzat i les semblances aplicades als resultats obtinguts en estudis amb l'ésser humà.

Passat un mes, començava a tenir una idea més clara de l'esquelet del treball, l'estudi del peix zebra com a model i la seva popularització, analitzant-ho amb un experiment sobre el desenvolupament embrionari utilitzant l'etanol com a tòxic. Aleshores em van proposar assistir a una sèrie de trobades organitzades pel PRBB, per ajudar als estudiants de batxillerat amb el treball de recerca i dóna'ls-hi eines, concretament es centraven en l'ús del peix zebra. En la visita vaig poder observar l'estabulari on habitaven els peixos, a més d'adquirir coneixements per

poder estructurar un bon experiment els quals han estat d'ajut pel correcte desenvolupament del projecte, després d'un matí d'aprenentatge vaig exposar la meva idea del treball. En aquell moment va ser quan es va desestructurar la meva hipòtesi, ja que, tenia diverses dificultats a l'hora de comparar l'efectivitat dels tractaments descoberts amb el peix zebra amb estudis en humans, no obstant els organitzadors recolzaven la idea de l'ús de l'alcohol per l'estudi del desenvolupament embrionari, també van proposar-me relacionar-ho amb el SAF. En aquelles alçades tenia ja un experiment plantejat, el qual consistia en mesurar el diàmetre dels ulls dels peixos així com prendre altres mesures de diferents parts del peix, per poder corroborar la hipòtesi.

Finalment vaig anar al laboratori de Zeclinics el qual també resideix en el PRBB, allà vaig exposar el tema i la metodologia que havia pensat a en Rafael Miñana el qual em va acompanyar i assessorar durant l'estança al laboratori a més d'aportar idees i ajuda durant el desenvolupament del treball, ell em va comentar que la part pràctica amb l'etanol estava bé però que, ja que estava en un laboratori professional podia enriquir el resultat canviant la manera d'analitzar els efectes, és per això que vam dissenyar decidir analitzar l'afectació al fetge i al sistema nerviós, ja que, els símptomes més greus en humans es presenten en aquestes. Així que un cop ja vaig tenir el meu experiment dissenyat, vaig començar a fer-los aplicant la metodologia concretada.

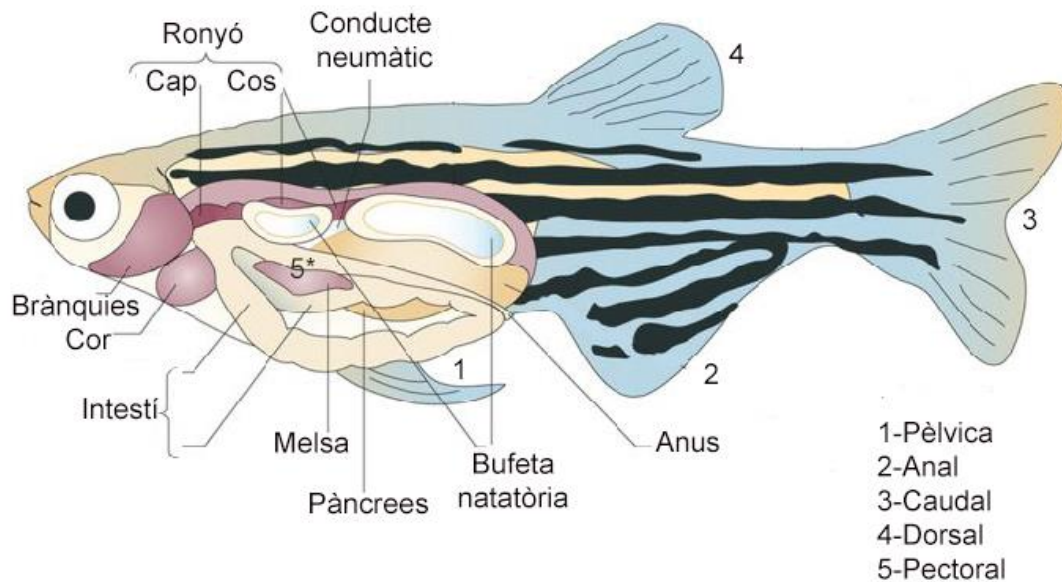
1.2. Peix zebra

El peix zebra (*Danio rerio*) és un petit peix ratllat d'uns 3-5 cm de longitud de la família dels Ciprínids i de l'ordre Cipriniformes, originari del sud-est asiàtic. Aquests són peixos allargats i amb forma fusiforme, és a dir, amb el cap acabat en punta i un cos més abombat. L'orientació de la boca apunta cap a dalt i presenten una dieta omnívora a base de zooplàncton i insectes.

Habiten en medis d'aigua dolça en zones tranquil·les i de poca fondària on hi ha abundància de plantes aquàtiques. Per poder-se desplaçar per un medi aquàtic usen un conjunt de cinc aletes (dorsal, caudal, anal, pèlvica i pectoral) per donar impuls, i la bufeta natatòria per regular la flotabilitat o en altres paraules la fondària, això s'aconsegueix mitjançant un intercanvi de gasos a través del

conduïte pneumàtic, aquests fan que la densitat del peix vari per tal de facilitar la natació en diferents profunditats. Per altra banda pertanyen al grup dels cardumen, per tant, naden sincronitzats en grup i són éssers socials.

En la següent imatge s'observen els òrgans principals de l'animal, entre ells la bufeta natatòria, situada en la part central del cos. Es pot destacar el cor, el fetge, la melsa, el pàncrees els quals es troben també en éssers humans.



Imatge 1. Il·lustració que destaca el ronyó, la bufeta natatòria, el conduïte neumàtic, les brànquies, l'intestí, la melsa, el pàncrees, l'anus i les diferents aletes.

1.3. Estudi del model animal

Prèviament a dur a terme les diferents pràctiques s'han d'adquirir uns certs coneixements sobre el model animal aplicats al seu ús en un laboratori professional.

Els peixos habiten en l'estabulari, es troben dins d'uns tancs connectats a un sistema que subministra aigua amb els nivells de sals correctes, classificats segons la seva etapa de creixement i marcats amb etiquetes que mostren el genotip dels individus de cada tanc així com la data amb que s'ha fet l'últim encreuament. Són alimentats principalment a base d'artemia (petit crustaci) triturada, 3 cops al dia. El seu fotoperíode és de 12h de llum i 12h de foscor i es mantenen a una temperatura de 26-28 °C.

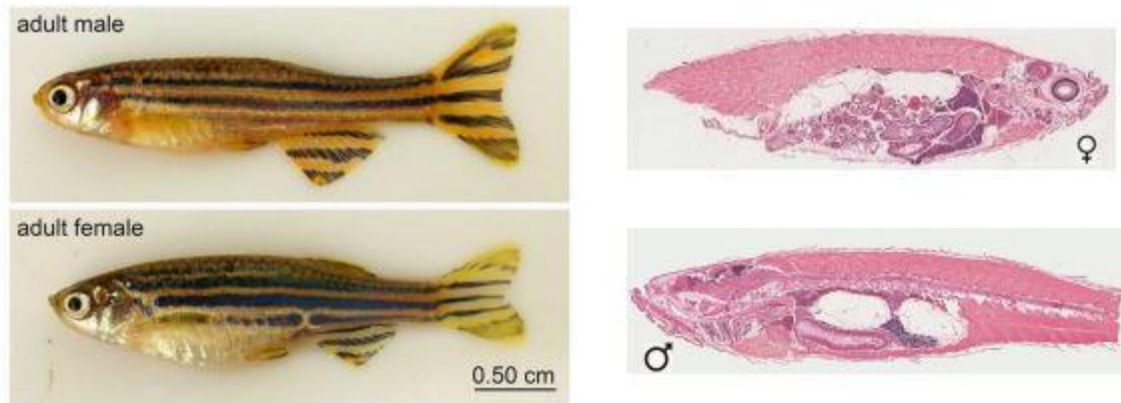
1.3.1. Dimorfisme sexual

El dimorfisme sexual és la variació d'aspectes fisiològics o morfològics entre mascles i femelles d'una mateixa espècie.

En el peix zebra podem observar aquests:

Mascles ♂	Femelles ♀
més petits i estilitzats	més grans i robustes
ventre pla	ventre protuberant i blanc
ratlles blaves i fosques	ratlles platejades i blaves
Coloració daurada	Coloració fosca i més blava
en la cavitat celòmica no hi ha ous	presenta ous en la cavitat celòmica
més actius	més lentes

Taula 1. Taula que destaca les diferències entre mascles i femelles del peix zebra



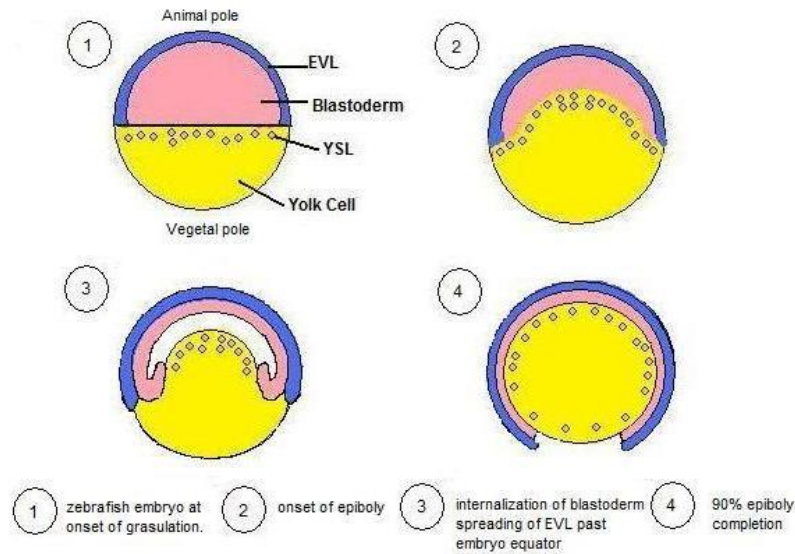
Imatge 2. Imatge que compara les diferències morfològiques i anatòmiques entre mascles i femelles del peix zebra.

1.3.1.Cicle Biològic

Com a conseqüència de ser un animal de sang freda, és a dir que no té cap mecanisme per regular la seva temperatura corporal, el seu metabolisme es veu afectat i per tant el seu creixement també. La temperatura establerta per l'estudi del peix zebra és 28.5 °C.

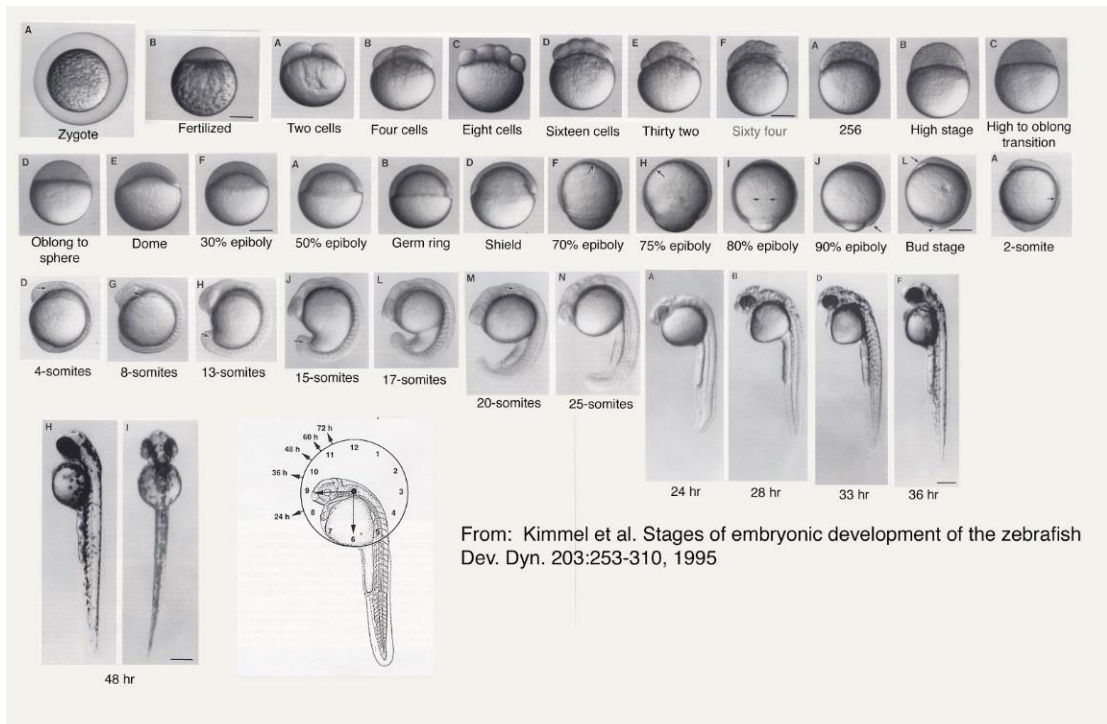
A partir de la fecundació de l'ou el desenvolupament embrionari té una durada de 7 dies, aquest procés es pot dividir diferents períodes de creixement.

- **Zigot** 0- $\frac{3}{4}$ hpf (hores post fertilització), es troba l'ou fecundat.
- **“Cleavage”** $\frac{3}{4}$ -2 $\frac{1}{4}$ hpf, comença la divisió cel·lular a partir d'una cèl·lula situada a sobre del sac vitel·lí.
- **Blàstula** 2 $\frac{1}{4}$ -5 $\frac{1}{4}$ hpf, les cèl·lules presenten una alta reproducció i es comença ha desenvolupar l'epibòlia, aquesta està formada per tres capes de teixits i descriu els moviments de les cèl·lules replicades, en el cas del peix zebra es repliquen envoltant el rovell.
- **Gàstrula** 5 $\frac{1}{4}$ -10 hpf, l'embrió mostra desenvolupada aproximadament el 50% de l'epibòlia.



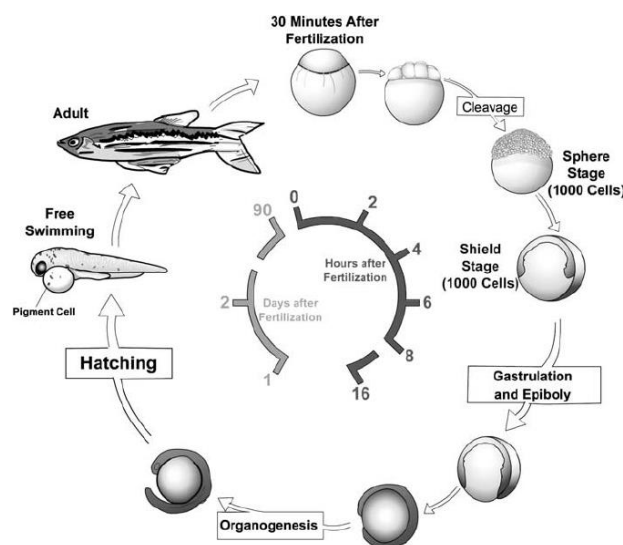
Imatge 3. Imatge que mostra el desenvolupament de l'epibòlia. Les 3 capes estan representades amb el color blau, el color rosa i els petits punts.

- **Període de segmentació** 10-24 hpf, es comença a distingir els somites, estructures segmentades sense cap especialització que posteriorment formaran músculs, ossos o pell i es presenten indicis dels primers òrgans com la cua la faringe o el teixit neuronal.
- **Pharyngula** 24-48 hpf, es pot observar els axis del cos, és a dir que hi ha una línia imaginària de referència usada per descriure la seva anatomia, en aquest cas l'embrió es veu encorbat envoltant el sac vitel·lí, a més en aquesta etapa es produeix la pigmentació junt amb el principi de les aletes i la majoria d'òrgans hi estan en desenvolupament aproximadament a les 36 hpf.
- **Període d'eclosió** 48-72 hpf, com el seu nom indica es produeix l'eclosió de l'ou.
- **Període de larva** 3-7 dpf (dies post fertilització), la bufeta natatòria es pot inflar, per tant les larves tenen la capacitat de moure's, als 4 dpf el batec del cor és visible igual que la pigmentació ventral i dorsal. Als 5 dpf hi ha una clara resposta òptica i el fetge és totalment funcional.



Imatge 4. Imatge que mostra els diferents fenotips en diversos moments en el desenvolupament embrionari. També classifica els períodes en diferents intervals agrupats en lletres en ordre alfabètic

Finalment les larves es considera un animal viu quan el sac vitel·lí és totalment absorbit, el sistema digestiu està en total rendiment i es produeix la primera deposició. Posteriorment el desenvolupament del peix zebra segueix fins a arribar als 3 mesos on es considera un individu adult i madur sexualment.



Imatge 5. Imatge que resumeix el cicle biològic del peix zebra, indicant el temps en hores pels primers períodes i dies per als finals.

1.4.SAF

La síndrome alcohòlica fetal és una malaltia minoritària registrada com a rara, no obstant és crònica, és a dir, que no té cura. Aquesta es genera quan es pren alcohol etílic durant el període de gestació, aquesta substància arriba al torrent sanguini de la mare i travessa la placenta entrant en contacte amb l'embrió, l'etanol resultarà tòxica en qualsevol moment de l'embaràs, en concret l'etapa més crítica és en el primer trimestre, a més no està determinada cap quantitat mínima d'ingesta, per tant l'única solució fiable és suprimint-ne el consum.

Diagnosticar aquest trastorn resulta difícil, ja que no hi ha cap prova mèdica específica, també pot haver-hi un ampli ventall de gravetat i tots els pacients no desenvolupen en el mateix grau els diferents trastorns, per tant és una malaltia pleiotròpica. És per això que el metge haurà de fer un diagnòstic observant els signes i símptomes de l'afectat més evidents i evidentment preguntar a la mare si va prendre alcohol durant l'embaràs. Com la majoria de drogues l'alcohol afecta majoritàriament en el cor, el sistema nerviós i el fetge, en el cas de la SAF el sistema nerviós es veu molt afectat i al ser aquest un pilar molt important en l'organisme genera gran amplitud de trastorns, igualment al cor, encara que els trastorns més problemàtics desenvolupats només hi són presents en 1/3 de la població afectada, en canvi l'afectació al fetge no genera cap dificultat hepàtica en el futur, ja que aquesta s'expressa en un fetge gras que amb poc temps es regenera en absència de tòxics.

Entre els símptomes es mostren diferents tipus de problemes entre ells:

Mèdics: malformacions en el cor i afectacions als ronyons i als ossos.

Relacionats amb el desenvolupament: trets facials anormals, baixa estatura i menor tamany del cap

D'aprenentatge: baixa capacitat de raonament i baix coeficient intel·lectual.

De conducta i socials: comportament hiperactiu, retrassos en la capacitat de dialogar i el llenguatge i risc de desenvolupar personalitats antisocials o depressió.

Tot i que com ja s'ha esmentat és incurable, existeixen una sèrie de tractaments com per exemple: atenció mèdica regular per tractar els problemes de salut associats, alguns medicaments per resoldre alguns símptomes, teràpia de comportament o educacional i certs factors de protecció com un monitor o l'absència de violència al voltant de l'afectat.

Per tenir una major comprensió de la SAF i els seus trastorns, s'han usat models animals per al seu estudi. El que ha resultat més eficient és el peix zebra encara que hagi estat introduït recentment, en aquest s'ha observat que els fenotips desenvolupats són homòlegs als dels humans, per exemple la distància entre els ulls reduïda o l'evident retard del creixement. També es troben aquestes similituds en l'afectació a òrgans o sistemes, en aquests casos es generen anormalitats en el cor i afeccions al sistema nerviós les quals generen dificultats motores i problemes en el desenvolupament.

2.Objectius i Hipòtesi

Hipòtesi: L'Etanol resulta tòxic per al desenvolupament embrionari del peix zebra.

Objectius:

- Entendre la biologia del zebrafish
- Obtenir coneixements i tècniques de laboratori per poder dur a terme els experiments
- Estudiar la locomoció dels peixos afectats per l'etanol
- Estudiar l'afectació al fetge dels peixos

3.Materials i mètodes

3.1.Materials

Els materials per a l'encreuament són aquests:

- Tanc de 9L amb reixeta pels ous
- Algues de plàstic
- Bales de vidre o objectes que simulin pedres

Els materials emprats per a tots els assajos són els següents:

- Placa de 96 pouets
- 60X* medi E3 (components per 2L):
 - 34.8 g NaCl
 - 1.6 g KCL
 - 5.8 g CaCl₂·2H₂O
 - 9.78 g MgCl₂·6H₂O
 - pH = 7.2 (amb NaOH 1M)
- 1X medi E3:
 - 16.5 mL de 60X E3 diluïts en 1 L d'H₂O
- Blau de metilè

- Etanol absolut desnaturalitzat
- Agarosa de baix punt de fusió
- Metansulfonat de tricaina
- Paraformaldèhid al 4%
- 1-fenil 2-tiourea (PTU)
- Solució tampó fosfat (PBS de l'anglès Phosphate Buffer Solution)
- MilliQ H₂O
- 20X SSC (de l'anglès saline-sodium citrate)
- Formamida
- Peròxid d'hidrogen
- Propilenglicol
- Oil Red O
- Glicerol al 80%
- Compostos analitzats:
 - Etanol 2%
 - Etanol 4%
 - E3 (control negatiu)
- Software EthoVision XT
- Software FIJI
- Larves de peix zebra de la línia Triple gènica (Tg), la qual presenta fluorescència en cèl·lules de la sang, el cor i el fetge.

*L'ús d'un número + X, s'utilitza per mostrar la concentració d'un component.

3.2.Mètodes

Preparació del tòxic

L'etanol es dissol en l'E3 per preparar les concentracions desitjades. Per procedir a la incubació del peix en el tòxic, el compost és diluït en E3 per obtenir la concentració desitjada, en aquest cas els subjectes experimentals foren exposats a medis al 2% i 4% d'etanol.

Obtenció de larves

Prèviament a l'obtenció de les larves s'ha de preparar el tanc on es durà a terme la reproducció, aquest té una reixeta al fons on es recolliran els ous. Primer s'afegeix al tanc algues de plàstic i bales per simular el seu medi natural, després s'omple d'aigua, seguit es dipositen mascles i femelles de la línia amb la qual es vol experimentar, amb l'ajut d'un salabret. Un cop es troben al tanc hi subministrem una dieta rica en proteïnes i lípids per afavorir la reproducció, l'encreuament es fa a la tarda, per tant els ous fertilitzats estaran llestos l'endemà al matí. Finalment s'ha d'etiquetar el tanc amb la data d'encreuament, el genotip dels peixos i la persona responsable.

Preparació de les larves

Els embrions fertilitzats de la línia Tg (cm1c2: GFP; fabp10: RFP; ela31: EGFP) es dipositen dividits en 3 plaques de petri en un medi d'E3 i blau de metilè (antifúngic utilitzat per prevenir possibles infeccions) omplert fins a la meitat, a més en una d'aquestes s'hi afegeix PTU per l'assaig d'hepatotoxicitat.

L'al·lel fabp10: RFP expressa proteïnes fluorescents de color vermell en totes les cèl·lules del fetge, les quals s'analitzaran per detectar l'hepatomegàlia.

A les 3hpf els embrions anormals o no fertilitzats es descarten i els aptes, es deixen desenvolupar fins a 5.5 dies post fertilització (dpf) a una temperatura de 28,5 °C, just quan el fetge està totalment desenvolupat

A les 24 i 48 hpf s'observen els embrions i els que presenten una coagulació o ous anormals es descarten.

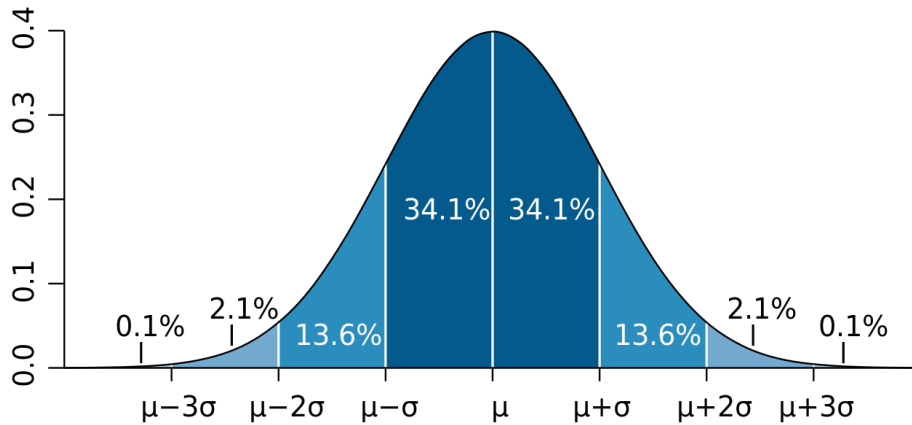
A les 96 hpf les larves de peix zebra s'incuben amb les solucions dels fàrmacs amb els quals es treballarà.

Assaig de locomoció

Les larves són incubades amb la substància durant 28-30 h a una temperatura de 28,5m °C. Posteriorment la neurotoxicitat és analitzada mitjançant la locomoció usant el software EthoVision XT 11.5, aquest usa la visió per computació per calcular els diferents aspectes associats al moviment com la distància, velocitat... amb el dispositiu DanioVision. Aquest sistema funciona amb una càmera situada a sobre d'un compartiment amb aigua la qual està fluïnt i un sensor de temperatura establert a 28 °C. La placa amb 96 pouets es situa al compartiment, el software es basa en modificar diferents cicles de llum i fosc per estimular el moviment del peix i amb l'ajuda del sistema aconseguir les dades. Després les larves romandran 20 minuts amb llum blanca per l'aclimatació. Finalment, els moviments dels peixos s'analitzaran sota les següents condicions: un període inicial de 10 minuts de fosc, després es repeteix dues vegades un cicle de 10 minuts de llum intensa seguit de 10 min de fosc. D'aquesta manera la distància total recorreguda, s'aconsegueix a través de la prova de llum/fosc la qual té 50 min de duració.

La neurotoxicitat és analitzada comparant els paràmetres obtinguts amb el control negatiu (E3) i el control positiu (etanol 2% i 4%). Per culpa dels ritmes circadianis, tots els assajos estan programats sobre les 13.00pm, ja que, en aquest interval de temps les larves del peix zebra presenten una activitat més alta.

Previament a l'anàlisi estadística s'aplica Saphiro-Wilk test per assegurar la normalitat de les resultats. Les dades es presenten amb la mitja \pm SEM (error estàndard mitjà). L'anàlisi estadística és realitzada amb One-way ANOVA test, comparades amb 1X E3 (control negatiu) i l'etanol (control positiu). Els valors (x) fora de l'interval: $-2 \cdot \text{Desviació estàndard} < x < 2 \cdot \text{Desviació estàndard}$, seran considerats valors atípics i per tant descartats de l'anàlisi estadística, ja que, els individus fora d'aquest interval estan massa allunyats de la mitjana i no es poden considerar representatius de la població d'estudi (estan fora de l'interval de confiança del 95.6%).



Gràfic 1. Gràfic que representa la distribució normal d'una població. Donada una població amb una mitjana μ , i una desviació estàndard σ el 95,6% dels individus es troben representats en l'interval $\mu-2\sigma < x < \mu+2\sigma$

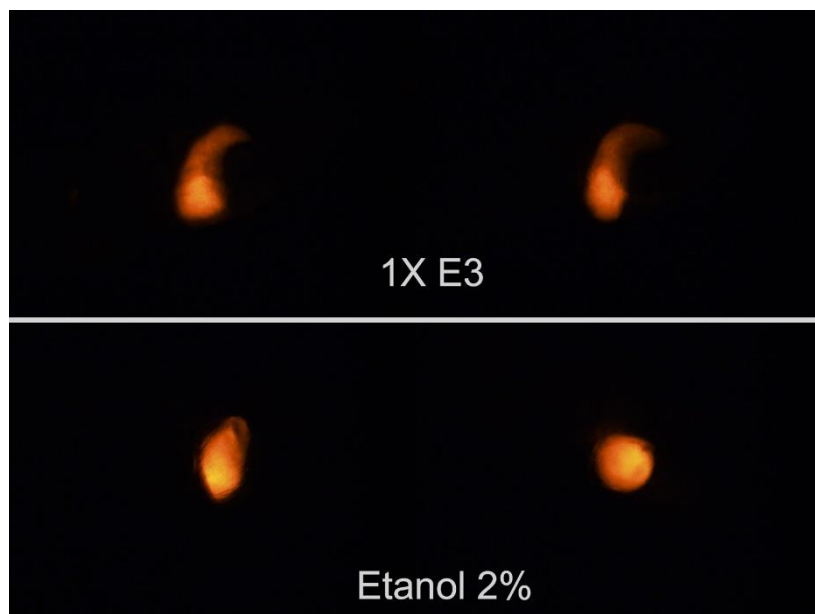
Assaig de toxicitat Hepàtica

Després de 32h de la incubació amb el fàrmac (128hpf) els embrions es fixen en una solució de paraformaldehid 4% de 2-4h a temperatura ambient i seguit es renten 3 cops amb PBS.

Per a l'avaluació de la toxicitat hepàtica, es tenen en compte aquests paràmetres:

- Yolk lipid (acumulació de lípids al rovell)
- Esteatosi hepàtica
- Hepatomegàlia

Les larves prèviament fixades s'observen sota un microscopi estèreo fluorescent (Olympus MVX10) recolzades en un motlle d'agarosa i es fotografien amb una càmera digital (Olympus DP71) amb l'ajut del software cell'D. Les imatges RFP (red fluorescent protein) filtrades s'analitzen mitjançant el software FIJI per detectar hepatomegàlia.



Imatge 6. Imatge que compara dos possibles fenotips del fetge en la prova d'hepatomegàlia. Fotografia feta en un microscopi estèreo fluorescent.

Més tard, l'esteatosi hepàtica i el yolk lipid s'avaluen mitjançant la tinció amb Oil Red O, que tinta els lípids d'un color vermell fosc intens, per tant les zones on hi hagi presència de lípids es veuran tintades. Les larves fixades no tractades amb PTU es decoloren amb una solució de lleixiu durant 20 minuts a temperatura ambient i seguit es renten 5 vegades amb PBS. Els embrions decolorats, primer es submergeixen en Propilenglicol (PG) al 85% durant 10 minuts, després en PG al 100% uns altres 10 minuts abans de ser tenyits amb Oil Red O al 0.5% en PG al 100% (tota la nit, a temperatura ambient i amb un balanceig elevat). Els embrions tintats amb Oil Red O es renten en PG al 100% durant 30 minuts, 50 minuts en PG al 85%, i 40 minuts en PG 85% amb el mateix volum de PBS. Per acabar, els embrions es renten una vegada amb PBS i afegint prèviament glicerol al 80%. Es fotografien recolzats en un motlle d'agarosa, i amb una capa augmentant la brillantor per detectar esteatosi o yolk lipid. Per a l'avaluació de esteatosi, les larves es consideren positives quan 3 o més gotes rodones de lípids són visibles dins del parènquima hepàtic.



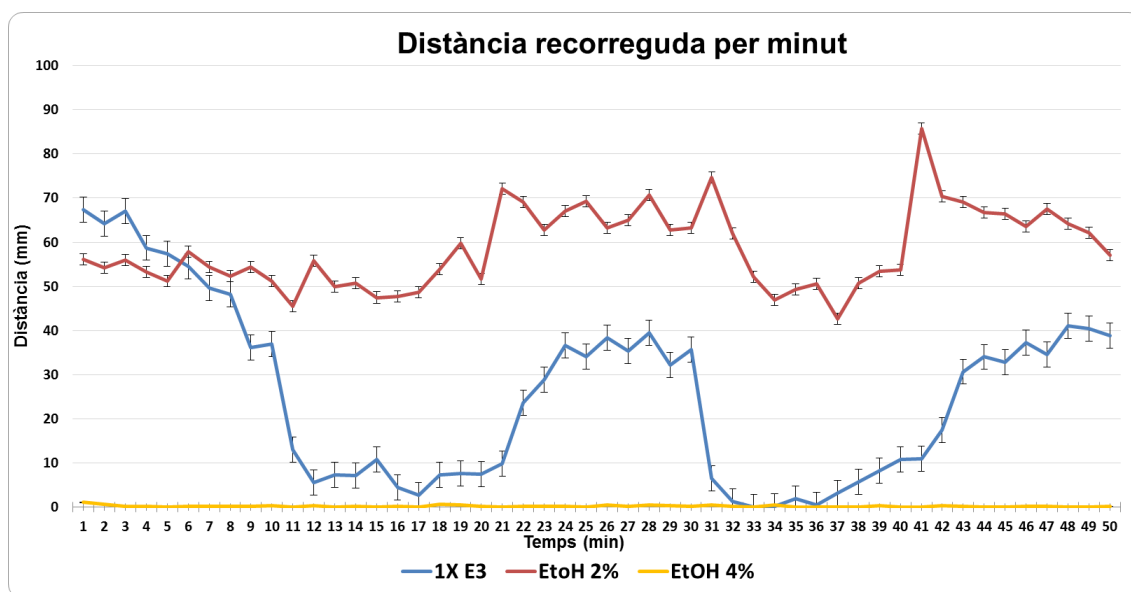
Imatge 7. Imatge que mostra els tres estats possibles en la prova d'esteatosi i yolk lipid. Cal tenir en compte que la zona vermella present en totes les fotografies és la bufeta natatòria. En primer lloc el control negatiu sense cap trastorn desenvolupat, en segon lloc amb yolk lipid i per últim amb esteatosi.

L'anàlisi estadístic serà igual al de l'assaig de locomoció, només canviant el One-way ANOVA en el cas de l'assaig d'esteatosi i yolk lipid per l'exact fisher test. Les dades es presenten amb la mitja \pm SEM (error estàndard mitjà).

4. Resultats

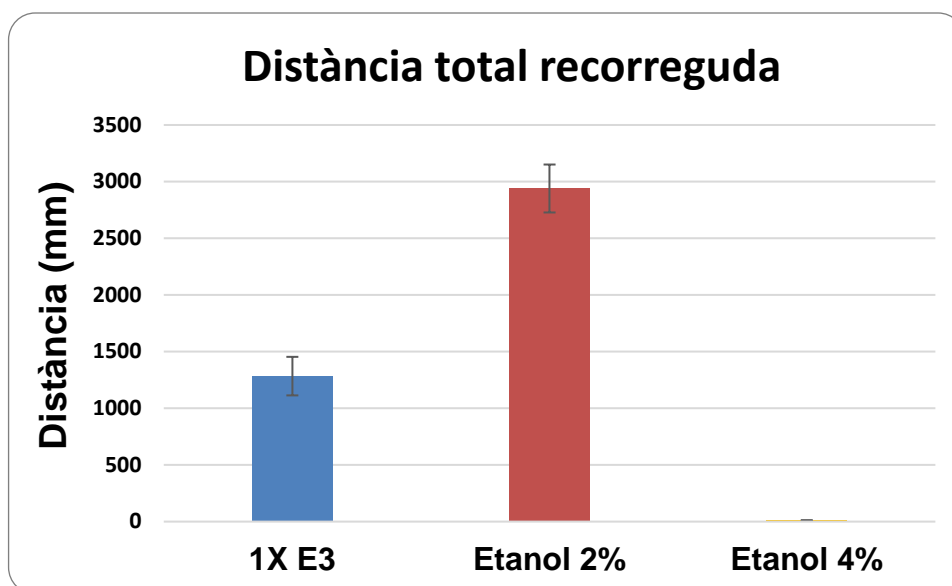
4.1. Neurotoxicitat. Locomoció

Amb l'ús del software EthoVision XT 11.5, s'ha obtingut el següent gràfic dins l'estudi de la locomoció, el qual mesura el comportament de les larves durant els 50 minuts de la prova, amb els seus respectius cicles de llum i fosc en intervals de 10 minuts començant per la fosc.



Gràfic 2. Gràfic de la distància recorreguda per minut analitzada a l'assaig de neurotoxicitat (locomoció).

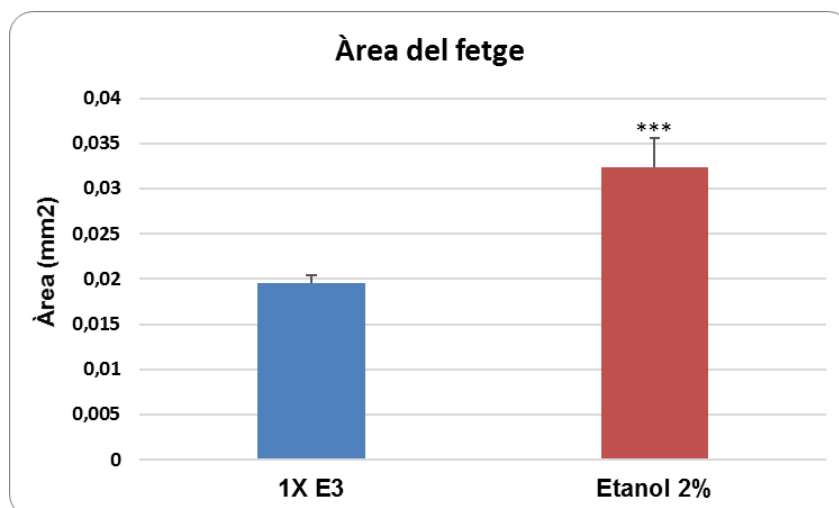
En el gràfic 3 es mostra la distància total recorreguda per cada grup. La distància total recorreguda en el grup 1X E3 és de $1283,85 \pm 170,06$ mm, el grup etanol 2% la distància total recorreguda és de $2939,43 \pm 211,59$ mm i el grup etanol 4% la distància total recorreguda és de $8,57 \pm 4,14$ mm.



Gràfic 3. Gràfic de la distància total recorreguda, analitzada en l'assaig de neurotoxicitat (locomoció). Els asteriscs indiquen la significància de l'anàlisi estadístic One-way ANOVA test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, per tant com més asteriscs, es tindrà un grau de confiança més elevat i en absència d'aquests no tindrà significància.

4.2. Hepatotoxicitat

4.2.1. Hepatomegàlia

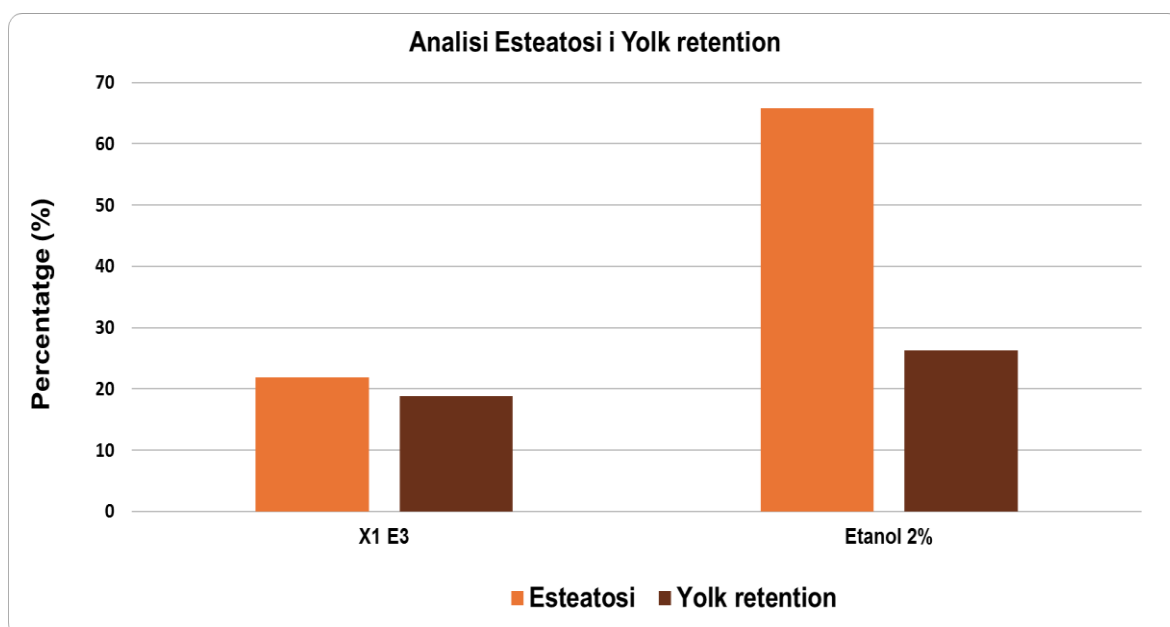


Gràfic 4. Gràfic de l'àrea del fetge en mm² analitzada en l'assaig d'hepatomegàlia. Els asteriscs indiquen la significància de l'anàlisi estadístic One-way ANOVA test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, per tant com més asteriscs, es tindrà un grau de confiança més elevat i en absència d'aquests no tindrà significança.

L'Àrea del fetge de les larves del grup 1XE3, han desenvolupat un fetge d'àrea $0,0195 \pm 0,000833 \text{ mm}^2$, en el grup etanol 2% presenten una àrea de $0,0323 \pm 0,003298 \text{ mm}^2$. Dades extretes del gràfic 4.

4.2.2. Esteatosi i Yolk lipid

Les larves del grup 1X E3 mostren un 21,88% d'esteatosi en la població i un 18,75% de yolk retention, en les del grup etanol 2% mostren un 65,79% d'esteatosi en la seva població i un 26,31% de yolk retention. Dades extretes del gràfic 5.



Gràfic 5. Gràfic de l'estudi de la esteatosi i el yolk retention expressat en el percentatge de cadascuna de les poblacions que presenten els trastorns. Els asteriscs indiquen la significància de l'anàlisi estadístic exact fisher test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, per tant com més asteriscs, es tindrà un grau de confiança més elevat i en absència d'aquests no tindrà significança.

4.3.Taula de Resultats

En la taula es mostren els resultats de les proves realitzades, distància total recorreguda, àrea del fetge i esteatosi i yolk lipid. Les dades han estat extretes del gràfic 3, gràfic 4 i gràfic 5 i es mostren amb la mitja \pm SEM.

Distància total recorreguda	Mitjana \pmSEM	p (significança)
1X E3	1283,85 \pm 170,06 mm	–
Etanol 2%	2939,43 \pm 211,59 mm	< 0
Etanol 4%	8,57 \pm 4,14 mm	< 0
Àrea fetge		
1X E3	0,0195 \pm 0,000833 mm ²	–
Etanol 2%	0,0323 \pm 0,003298 mm ²	0,0009
Esteatosi		
1X E3	21,88%	–
Etanol 2%	65,79%	< 0
Yolk retention		
1X E3	18.75%	–
Etanol 2%	26.31%	0,138910924

Taula 2. Taula que mostra els resultats de tots els assajos junt amb la p. En cas que la casella de la significança sigui verda, aquesta resultarà diferent estadísticament, en canvi si és vermella no presentarà cap diferència estadística.

5.Discussió

Amb els resultats obtinguts es pot observar clarament que tant l'afectació al sistema nerviós (neurotoxicitat) com al fetge (hepatotoxicitat) ha estat greu, ja que, s'han desenvolupat trastorns o símptomes negatius per al correcte desenvolupament i viabilitat de les larves, de fet, el grup etanol al 4% poc després de l'aplicació del tòxic i de l'assaig de locomoció van ser descartats de l'anàlisi d'hepatotoxicitat degut al col·lapse en l'organisme, a més a simple vista les larves exposades a l'etanol presenten diverses deformacions físiques molt evidents.

Locomoció:

En primer lloc en la prova de locomoció de les larves, s'observa que el grup etanol 2% mostra una distància total recorreguda significativament més gran, per tant i amb l'ajut del gràfic de distància recorreguda per minut es pot afirmar que presenten una hiperlocomoció, per altra banda les larves del grup etanol al 4% presenten una hipolocomoció, ja que la distància recorreguda és pràcticament nul·la i significantment menor que la del grup control.

Hepatotoxicitat:

En segon lloc es troba l'anàlisi de l'hepatotoxicitat, en aquest es troben dues proves. La prova d'hepatomegalia la qual analitza l'àrea del fetge, mostra que el grup d'etanol al 2% té una àrea més gran estadísticament diferent amb la del grup 1X E3, és per això que presenten hepatomegalia, ja que aquesta expressa un fetge gras. La prova d'esteatosi i yolk lipid, analitza si aquests dos trastorns estan presents en les larves dels dos grups. Després de l'experiment es pot concretar que el yolk lipid expressat amb l'acumulació de lípids al rovell, no presenta diferències significatives entre el control i el grup positiu, que donaria a entendre que la presència d'etanol no afectaria a aquest paràmetre. Tanmateix, els casos d'esteatosi expressats en l'acumulació de lípids en el fetge, són més alts en el grup d'etanol 2%, així que l'alcohol afecta directament al fetge, ja que l'acumulació de lípids augmenta només en aquesta zona.

Aquest fet ens indica que podria ser un problema relacionat amb el metabolisme dels lípids que es troben en el sac vitel·lí.

Tot i que s'han obtingut uns resultats coherents (major grau de deformacions físiques en presència d'etanol), en aquest estudi les deformacions exagerades de les larves del grup etanol 2% ha sigut força més elevat comparades amb d'altres estudis externs. Aquest fet indica que hi hagin pogut haver errors metodològics o bé interferències d'altres substàncies en el procés. En concret l'ús del despigmentant PTU podria haver afectat a aquestes deformacions, ja que aquesta molècula a part d'inhibir els enzims implicats en la pigmentació podria generar efectes secundaris. Per tant es podria fer una repetició dels assajos per reafirmar la repetibilitat del mètode i de les conclusions extretes.

6.Conclusions

Abans de concloure cal dir que els resultats obtinguts han estat analitzats estadísticament i són diferents en respecte el grup control amb un 99.9% de confiança, menys en l'estudi del "yolk retention". Per tant es podrà extreure unes conclusions concises.

L'estudi de la neurotoxicitat analitzada amb l'assaig de locomoció demostra que l'etanol provoca danys en el sistema nerviós durant el desenvolupament embrionari, que es tradueix en una alteració evident de la conducta.

L'assaig d'hepatomegàlia ha causat una sèrie alteracions en el fetge durant el desenvolupament embrionari, ja que, s'observa una major àrea en aquest òrgan. Per altra banda l'assaig d'esteatosi i yolk lipid, evidencia que hi ha una major població amb esteatosi amb la presència d'etanol en el desenvolupament embrionari que es defineix amb l'acumulació de lípids en la zona del fetge, no obstant queda concretat que l'aparició de yolk lipid no té una diferència estadísticament significat amb el grup control, per tant no està relacionat amb la presència d'etanol en el desenvolupament embrionari. En conclusió la toxicitat hepàtica analitzada amb els anteriors assajos manifesta que l'etanol provoca danys hepàtics durant el desenvolupament embrionari.

Després d'aquestes afirmacions es pot corroborar que la hipòtesi "l'etanol resulta tòxic per al desenvolupament embrionari del peix zebra" resulta encertada degut a les afectacions prèviament explicades. A més deixa la porta oberta per futures investigacions per trobar un possible tractament per atenuar els símptomes desenvolupats.

7.Ètica

En tot el treball s'ha estat plantejant els models animals per dur a terme la recerca biomèdica, en concret amb el peix zebra. No obstant s'està parlant d'un ésser viu. En el referent a aquest tema no es pot donar una veritat absoluta, ja que aquest genera un conflicte ètic el qual afecta a la moral, per tant mostraré el meu punt de vista.

Quan es critica l'ús de models animals s'argumenta que els investigadors adquireixen una superioritat moral a l'hora de decidir sobre la vida d'altres éssers vius, la qual no haurien de tenir. En dir tal afirmació, s'estan deixant de banda molts altres casos on l'humà presenta aquesta actitud, com per exemple animals que habiten en zoològics, tota la indústria càrnica o els destinats a la indústria tèxtil que tampoc gaudirà d'una millor qualitat de vida envers la d'un laboratori. L'única diferencia, és que el desenvolupament d'una vacuna salva milions de vides i el fet de tenir un jersei nou en l'armari no. Sobretot amb aquest discurs s'ha d'evitar caure en la hipocresia, és a dir que no es pot pretendre voler que els afectats de càncer puguin poder-se curar i a la vegada no recolzar les investigacions en aquest àmbit.

Per un altre costat cal dir, que han d'existir unes certes regulacions en l'àmbit legislatiu, perquè encara que la recerca és totalment necessària, els assajos aplicats han de tenir uns fonaments sòlids i no desenvolupar hipòtesi on els tractaments siguin molt agressius i a sobre no tinguin una bona justificació. Finalment s'ha de tenir en compte el nivell de consciència de l'espècie escollida, la qual influeix en la pròpia crueltat dels actes, un exemple seria que no és el mateix forçar el desenvolupament d'un càncer en un cuc que en un ximpanzé. En resum s'ha d'evitar en la mesura del possible l'ús de models in-vivo, ja que es poden trobar altres vies, com cultius de cèl·lules in-vitro o usar un software

prèviament programat per generar dades igual que ho faria un animal o sistema en concret in-silico.

Per acabar també es troben casos com l'ús de larves, ja que aquestes estan durant el desenvolupament embrionari i encara que són considerades un model in-vivo, no són considerades com animals pel fet que no poden fer les tres funcions bàsiques (nutrició, relació i reproducció) per si mateixes.

8. Bibliografia i Webgrafia

Llibres o articles usats per al desenvolupament del treball:

-ZeGlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish. **Carles Cornet, Simone Calzolari , Rafael Miñana-Prieto, Sylvia Dyballa, Els van Doornmalen, Helma Rutjes, Thierry Savy, Davide D'Amico, i Javier Terriente**

-The Development and Morphology of Zebrafish after Embryonic Ethanol Exposure. **Frances Lee**

-Long Term Effects of Early Embryonic Ethanol Exposure, on Behavioural Preformance and Learning in Zebrafish, Danio rerio. **Yohaán Fernandes**

-Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. **Charles B. Kimmel, William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullman, i Thomas F. Schilling**

-Zebrafish. **Christiane Nusslein-Volhard, Ralf Dahm**

-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**

Webs usades per al desenvolupament del treball:

[-https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000911.htm](https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000911.htm)

[-https://web.gencat.cat/ca/actualitat/detall/Consum-problematic-dalcohol](https://web.gencat.cat/ca/actualitat/detall/Consum-problematic-dalcohol)

[-https://medlineplus.gov/spanish/fetalalcoholspectrumdisorders.html](https://medlineplus.gov/spanish/fetalalcoholspectrumdisorders.html)

[-https://speakingofresearch.com/2016/09/06/the-ethics-and-value-of-responsible-animal-research/](https://speakingofresearch.com/2016/09/06/the-ethics-and-value-of-responsible-animal-research/)

9. Conclusions del treball de recerca i Agraïments

En l'últim any he estat treballant en aquest projecte, hi ha hagut etapes de molta tranquil·litat i d'altres on només vius per acabar el treball. Analitzant el conjunt, però, et trobes que has donat el teu màxim, arribant a un producte final que ni tan sols t'haguessis imaginat a l'inici.

Evidentment un es sent orgullós de la seva feina, perquè ets només tu el que ha viscut tota aquesta aventura i valors cada petita dificultat que ha sorgit en el camí i les quals has superat d'una manera o altra. Jo definiria el moment més problemàtic com al inici de tot, ja que en aquest punt has de començar a esculpir un projecte que no saps com serà però sí que saps que influenciarà molt en el teu futur, és per aquest motiu que no existeix cap motivació i tot el pes d'aquest futur no tan llunyà recau sobre tu. No obstant en desenvolupar una petita idea que et genera un interès, comença a brotar la motivació la qual fa que sense adonar-te treballis com mai havies pensat, i poc a poc obres pas cap al resultat que havies somniat. Un cop acabat, et comences ha plantejar diferents coses. Te'n adones que gràcies a aquesta experiència, has assolit tot una sèrie de coneixements molt rics, aquests no són exclusivament directes del treball sinó que en sortir del teu cercle de confort necessites eines per poder anar cap endavant i concloure amb els teus objectius.

En síntesi jo catalogaria el treball de recerca com una tasca que has odiat i estimat a parts iguals, però que si s'ha fet degudament, s'obté un resultat molt gratificant.

Queda per remarcar que no podria a ver fet aquest projecte sense l'ajut de moltes persones. Primer de tot donar gràcies als meus dos tutors Marta Moles i David Mengual per corregir-me els errors i indicar-me el camí a seguir, no menys important la Gemma Nuñez i Juan Ramos els quals van donar-me el primer impuls per a treballar amb el peix zebra. Per altra banda destacar a l'Ignasi Shaun per facilitar-me l'entrada als laboratoris de Zeclinics, durant l'estança allà agrair també a tot l'equip i sobretot a en Rafael Miñana sense el qual aquest projecte no hagués estat possible.

