

DARETEST: El pez cebra como modelo animal en investigación alimentaria: evaluación de la seguridad y de la efectividad de ingredientes y modelo de acuicultura

INFORME FINAL 2009-2011

Equipo de investigación:

Sandra Rainieri

Miguel Angel Pardo

Usua Oyarbide

Maider Olasagasti

Nagore Egurrola

M. José Sierra

Desarrollo de métodos alternativos basados en la respuesta genómica en embriones y larvas de pez cebra para las siguientes aplicaciones:

- 1) Determinación de la toxicidad de nuevos ingredientes alimentarios: el caso de las nanopartículas metálicas.
- 2) Determinación de la efectividad de nuevos ingredientes alimentarios: evaluación del efecto inmunoestimulante.
- 3) Determinación del efecto inmunoestimulante de moléculas con potencial empleo como suplemento de pienso en acuicultura.

1. Estudio de toxicidad: caso de las nanopartículas metálicas.

INTRODUCCIÓN

Nanopartículas (NPs) y Nanotecnologías (NT) en Industria Alimentaria



Avance tecnológico

- a. Ingredientes alimentarios de dimensión nano o nano-encapsulados
- b. Nano-estructuras que puedan causar la modificación física de la matriz alimentaria
- c. Material con NP incorporadas para envases de alimentos
- d. Biosensores para la detección de la calidad del alimento

Características NPs

- ✓ NPs \neq Tamaño “convencional”
- ✓ Ratio Superficie/Volumen \longrightarrow Más reactivas
- ✓ Propiedades eléctricas, ópticas y magnéticas más evidentes

- Efecto y comportamiento imprevisible
- Características variables dependiendo del tratamiento y de las condiciones; tendencia a la agregación
- Combinación con proteínas provocando cambios de conformación

PROBLEMA

- Es difícil determinar correctamente el efecto de las NPs en los organismos vivos.
- No existen test de toxicidad estándar para determinar el nivel de seguridad de estas partículas para la salud humana.

Desarrollar una metodología segura y eficaz para evaluar de los efectos tóxicos de NPs metálicas en un modelo de vertebrado.

Para ello hemos utilizado:

- Una NPs metálica entre las más utilizadas en alimentación: nanoplata (nAg)
- El modelo animal pez cebra en estadios tempranos del desarrollo

Nanoplate (nAg): importante efecto antibacteriano



- Envases alimentarios



- Electrodomésticos



- Suplemento alimenticio

Pez cebra (*Danio rerio*)

Características generales

- Pequeño pez de agua dulce (≈ 5 cm)
- Se reproduce durante todo el año
- Tiempo de generación: 3-5 meses.
- Produce hasta 300 huevos (fecundados en el agua)
- Embriones transparentes
- Comparte muchas características con los vertebrados
- Genoma completamente secuenciado

Aplicaciones en investigación científica

Toxicología medioambiental

Biología del desarrollo

Farmacología

Medicina: Cáncer

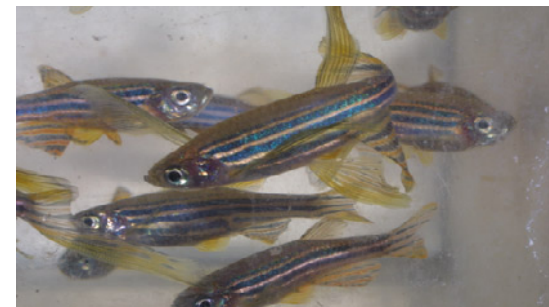
Sistema cardiovascular

Inmunidad y inflamación

Desordenes metabólicos

Desordenes neurológicos

Etc.



- Caracterización del material
- Definición del protocolo de exposición
- Evaluación de los efectos en el modelo animal

Nanoplata coloidal comercial



TEM (Transmission Electron Microscope)

Definición forma NPs

SEM (Scanning Electron Microscope)

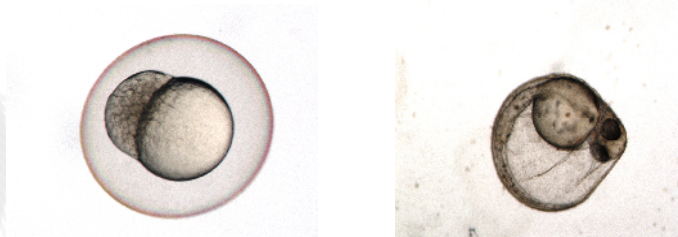
Definición dimensión NPs

DLS (Dynamic light scattering Technique)

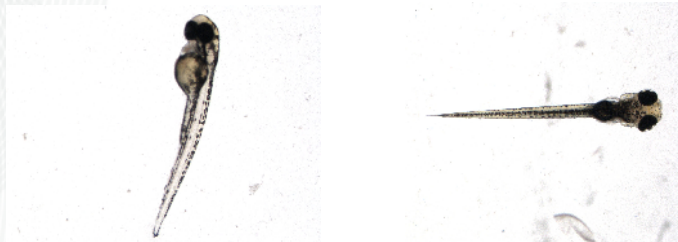
Definición nivel agregación

Rango de tiempo exposición

4 hpf → 48 hpf



72 hpf → 120 hpf



96 hpf → 120 hpf



Tiempo total

48 h

48 h

24 h

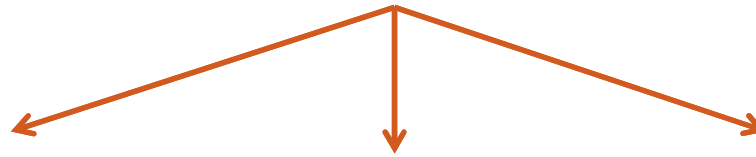
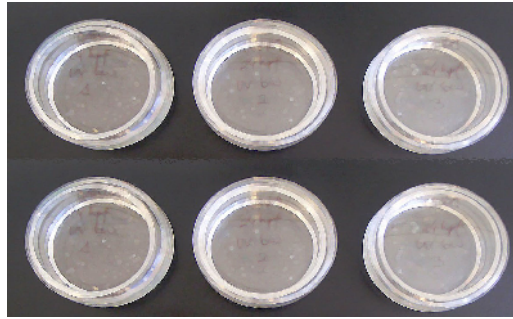
Parámetros analizados

- Absorción NPs
- Efectos detectables:
 - Mortalidad
 - Expresión génica

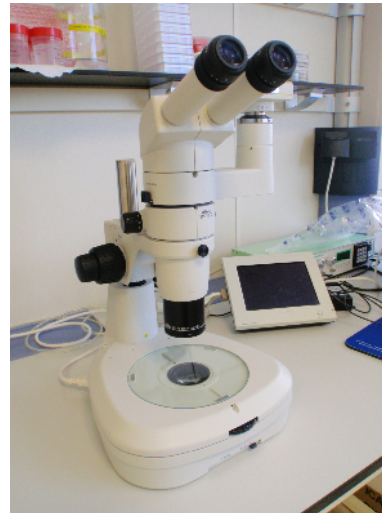
Métodos

DEFINICIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXPOSICIÓN ÓPTIMO

Exposición de lotes de 30 embriones a 27° C en placas Petri con 10 ml de solución en embryo-water



Absorción Ag por Espectrometría Atómica



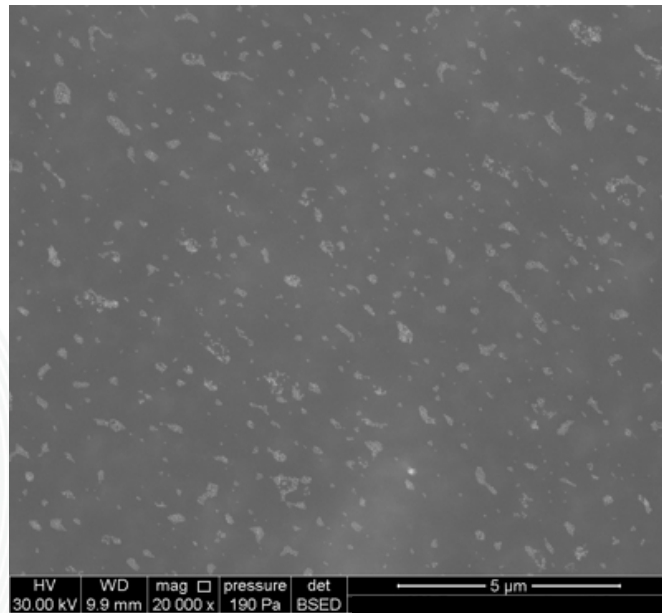
Mortalidad por observación lupa



Expresión génica por RT-PCR

Resultados

CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL



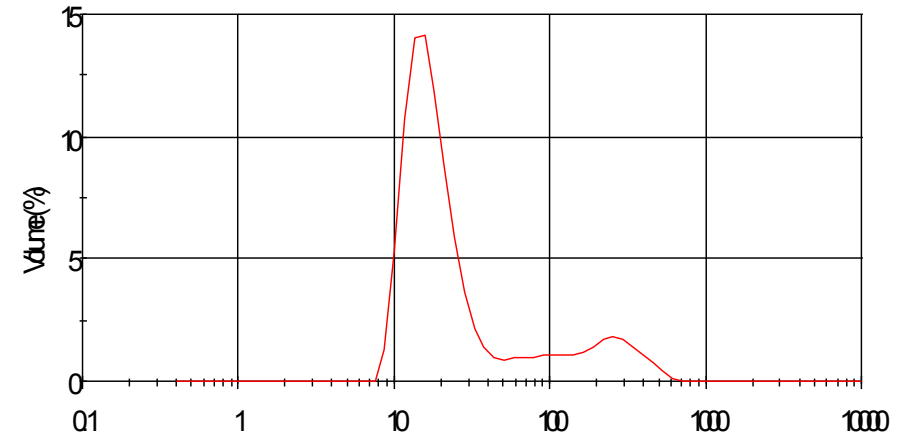
FORMA: poliédrica

DIMENSION PARTICULAS: 15-28 nm

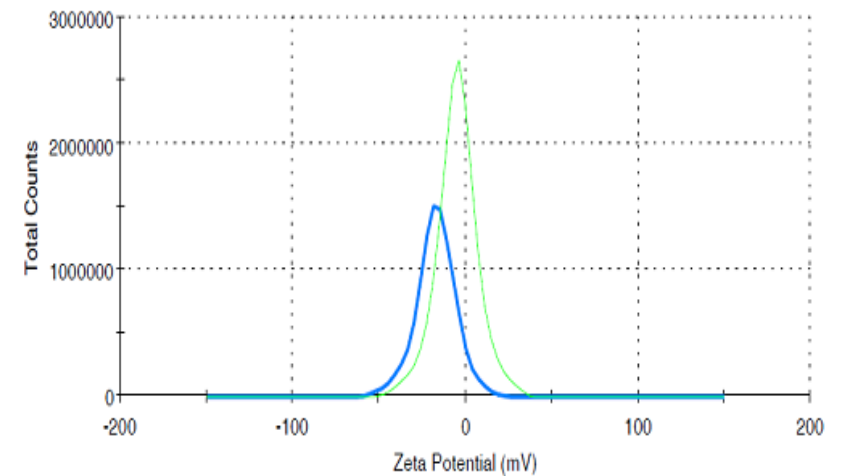
POTENCIAL-Z: -17.1 Mv

AGREGACIÓN: baja

Dimensión partículas (DLS)

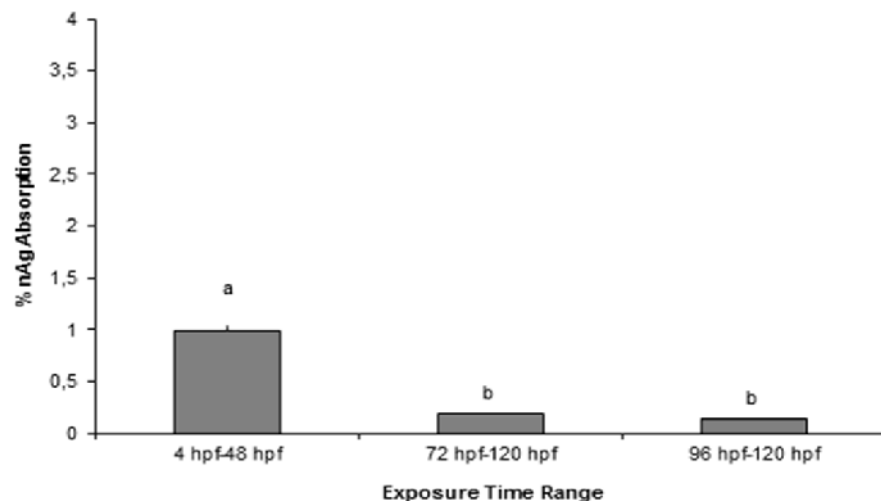


Zeta Potential Distribution



Record 29: nAg 5ppm Record 30: nAg 10000ppm

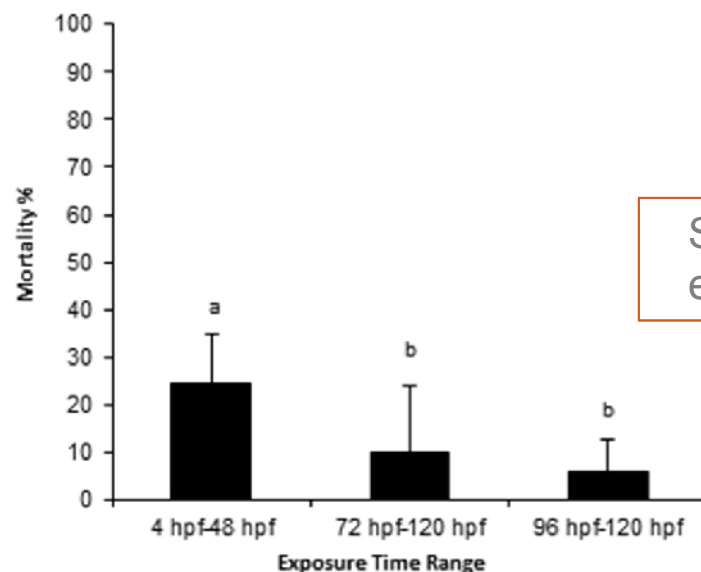
Absorción de plata por parte de embriones y larvas expuestos



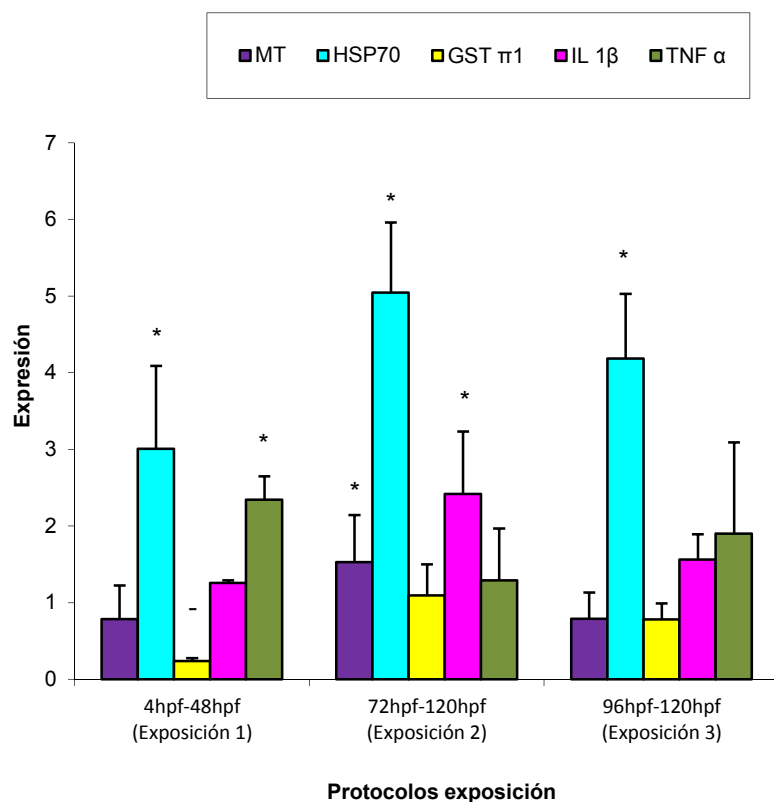
Se observó el mayor nivel de absorción de plata en el caso de la exposición 1 (4hpf-48hpf).

Imágenes por SEM nos confirmaron que solo en las exposiciones 2 y 3 la nAg entra dentro del animal, y en la exposición 1 se queda en la superficie del corion.

Mortalidad detectada con los diferentes protocolos utilizados



Se observó el mayor nivel de mortalidad en el caso de la exposición 1 (4hpf-48hpf).



Se observó en todos los casos la inducción del gen *HSP70*.

La exposición 1 y 2 causaron la expresión de genes diferentes. Esto probablemente es debido a que en la exposición 2 la nAg entra dentro del animal mientras que en la exposición 1 no y los efectos pueden deberse a otros tipos de acción que no es el contacto de las NPs con el animal.

La exposición 3 causó la expresión de un solo gen. Esto probablemente es debido a que el tiempo de exposición (24h) es demasiado breve para causar un efecto comparable con las otras dos exposiciones.

Caracterización. Se detectó un tamaño de aproximadamente 20 nm en la solución testada. La solución se presentó bien solubilizada en el medio y con una dispersión homogénea.

Absorción. Embriones y larvas absorbieron un nivel de nAg muy bajo ($< 1\%$) El nivel más alto de absorción se detectó en la exposición 1.

Distribución nAg. Solo en los protocolos de exposición 2 y 3 la nAg entró en las larvas.

Mortalidad. El nivel de mortalidad más alto se encontró en el protocolo de exposición 1.

Expresión génica. Los cambios mayores en expresión génica se detectaron en los protocolos 1 y 2, aunque estos cambios eran diferentes entre las dos condiciones. Esto indica que los procesos de toxicidad son diferentes.

- Ensayos de toxicidad efectuados con larvas eclosionadas aseguran resultados más fiables cuando se testan NPs.
- Concretamente el protocolo de exposición 2 (**72hpf - 120hpf**) ha resultado el más adecuado para llevar a cabo test de toxicidad con nAg.
- Es recomendable no utilizar embriones con corion en test de toxicidad de NPs.

2. Estudio de efectividad: evaluación del efecto inmuoestimulante

INTRODUCCIÓN

Creciente interés en la identificación y caracterización de moléculas funcionales en el sector alimentario.

El pez cebra representa un sistema ideal para evaluar la efectividad de dichas moléculas sobre todo a nivel de cribado inicial, en cuanto permite la evaluación de efectos en un organismo entero de manera rápida y económica.

OBJETIVO

Desarrollar un método simple, económico y ético para evaluar el potencial efecto inmunoestimulante de nuevos ingredientes alimentarios funcionales.

2. Estudio de efectividad: evaluación del efecto inmuoestimulante

INTRODUCCIÓN

Sistema inmune: Innato (no-especifico) y adquirido (especifico)

El sistema inmune innato es el sistema de defensa más temprano. No es específico y no depende de anterior reconocimiento de las estructuras superficiales de los invasores. Reacciona muy rápidamente.

INDUCCIÓN DEL SISTEMA INMUNE

Receptores de patrones
moleculares asociados a
patógenos (PAMPs)

Daño al tejido del huésped debido
a infección, necrosis o muerte
celular.

2. Estudio de efectividad: evaluación del efecto inmuoestimulante

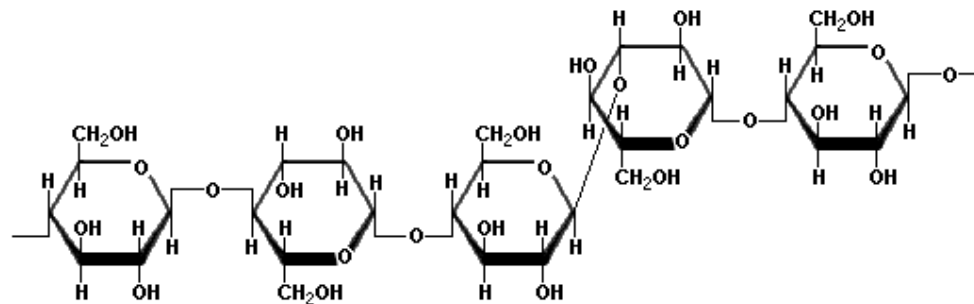
INTRODUCCIÓN

β - glucano

Importante polisacárido que se encuentra en la pared celular de bacterias, hongos y plantas (PAMP).

Los glucanos son immuno-estimulantes reconocidos que incrementan la inmunidad y la resistencia a enfermedades en los vertebrados.

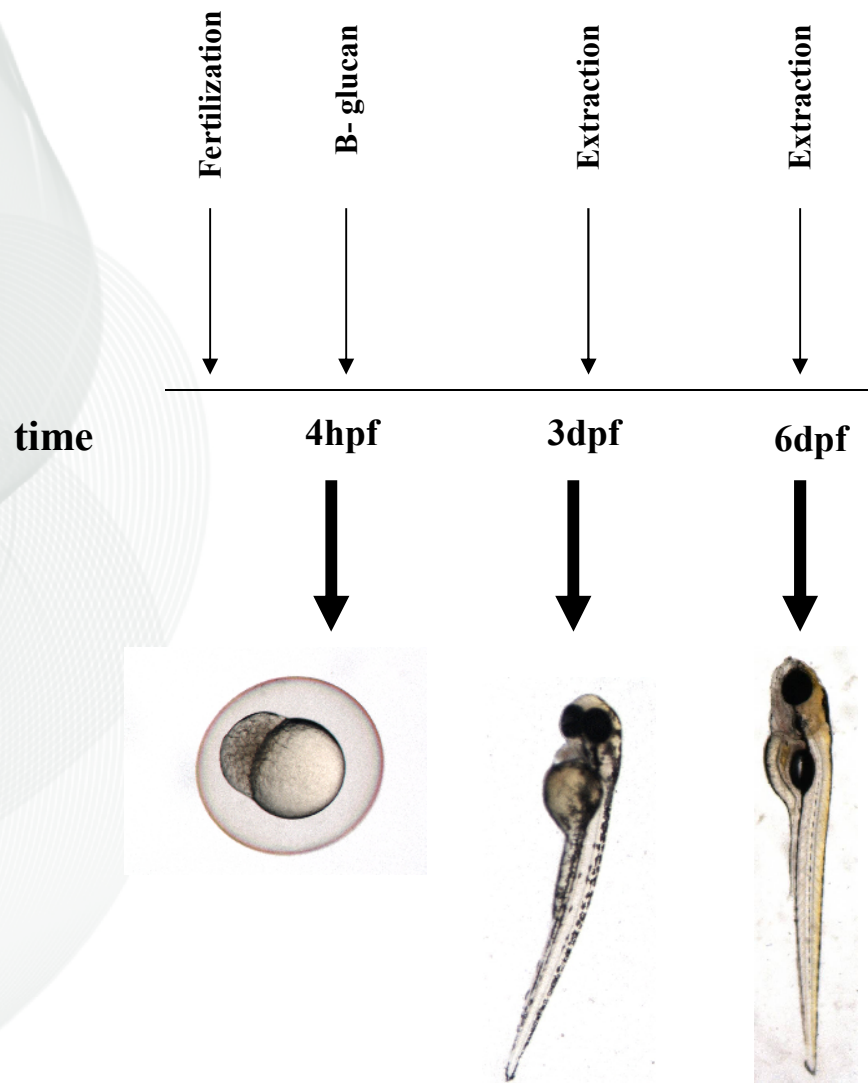
(Bricknell and Dalmo, 2005; Ai *et al* 2007, etc.)



HIPOTESIS DE TRABAJO

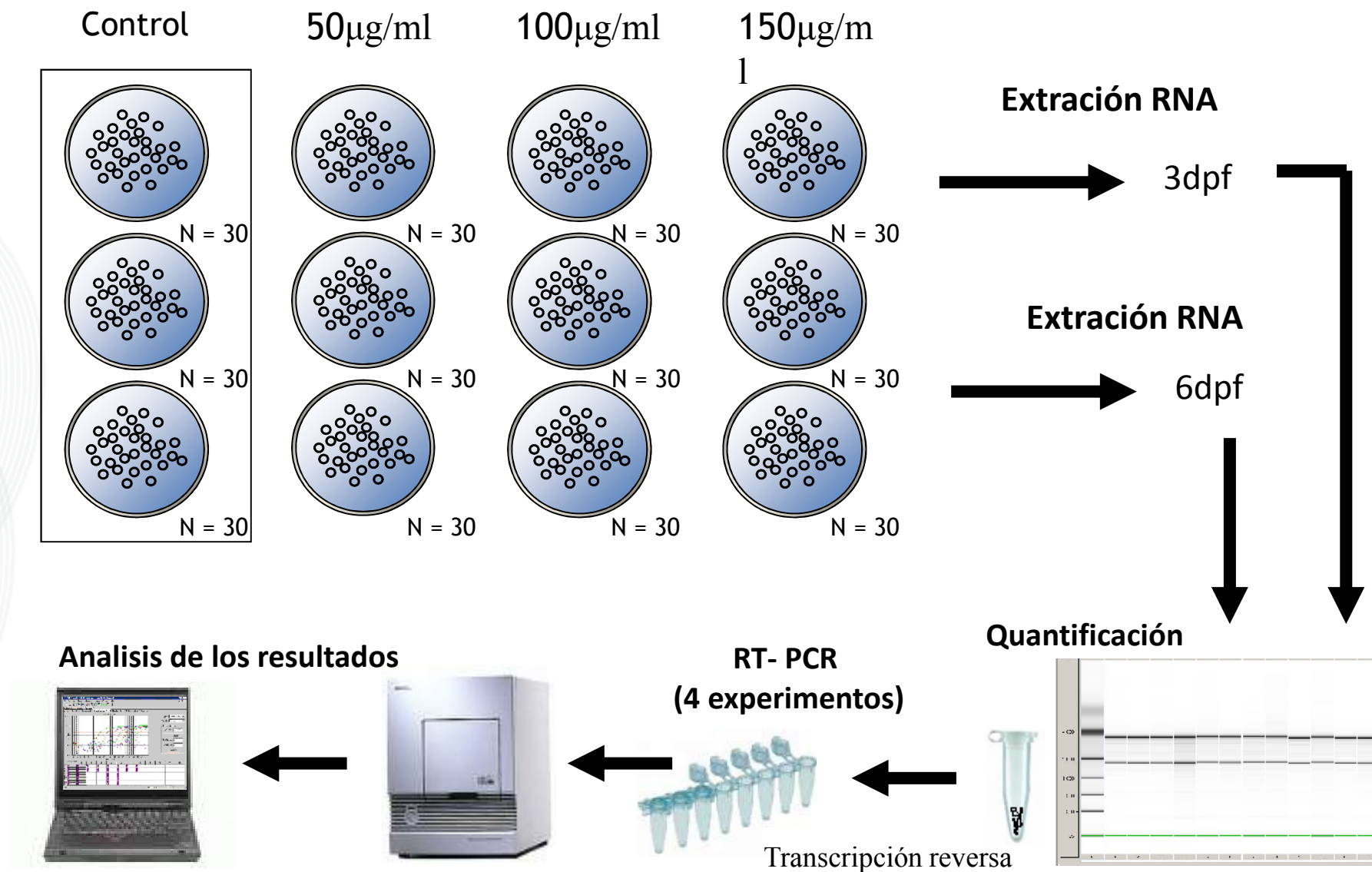
- **QUÉ** genes?
- **CUANDO** realizar el experimento?
- **DURANTE CUANTO TIEMPO** exponer los animales al contacto con β - glucano?





Para confirmar que los genes seleccionados se expresaban en larvas:

- Hemos testado larvas de edad de 3 y 6 dpf (días post fecundación).
- Las hemos expuesto a diferentes concentraciones de β -glucan (50, 100 y 150 μ g/ml)
- Hemos analizado la expresión de los genes seleccionados.

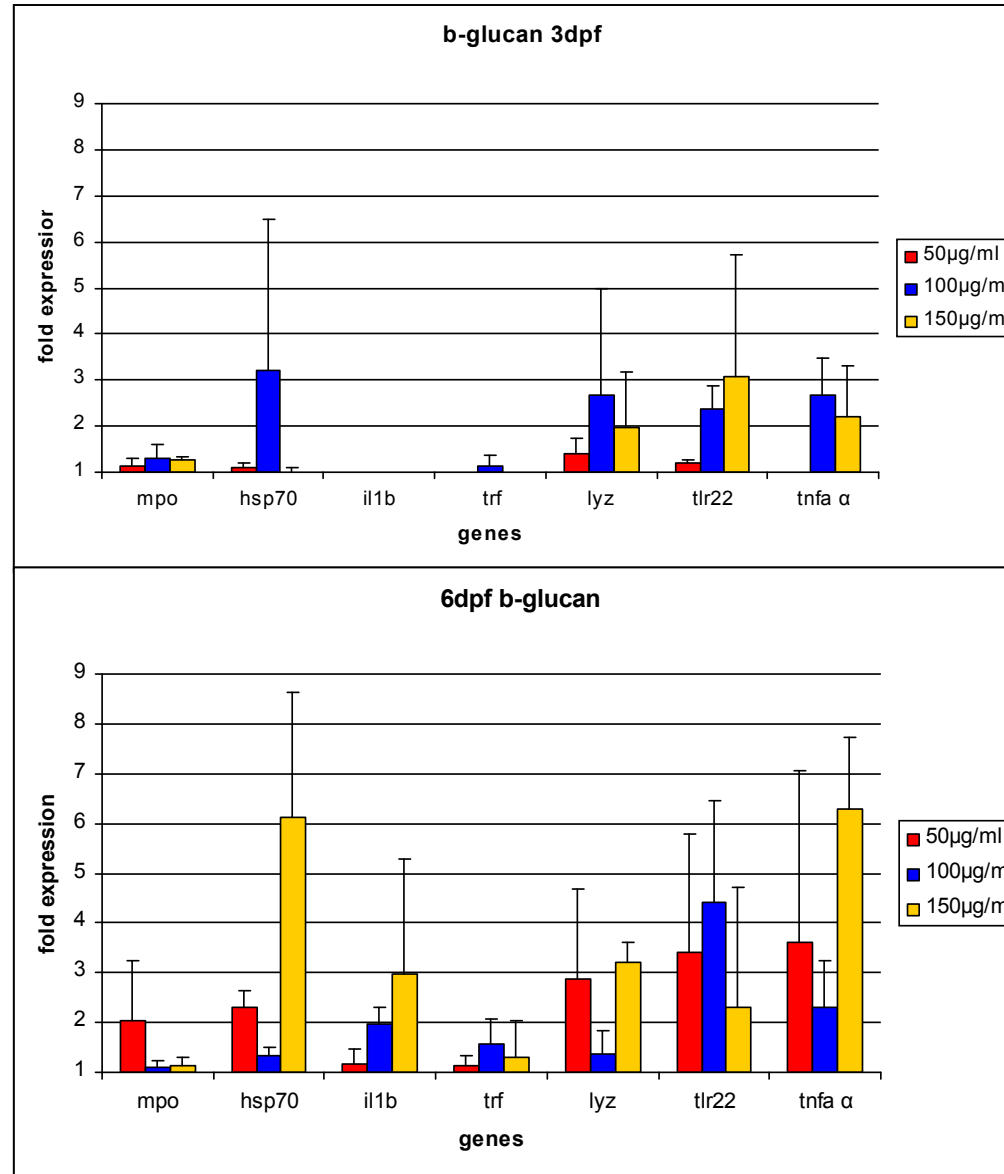


Niveles de expresión génica de marcadores seleccionados

Edad (dpf)/ Ct	<i>HSP70</i>	<i>IL1β</i>	<i>LYZ</i>	<i>MPX</i>	<i>TLR22</i>	<i>TNF α</i>	<i>TRF</i>	<i>β ACT*</i>
3	25.3 \pm 0.5	30.8 \pm 0.8	25.7 \pm 0.6	27.1 \pm 0.8	31.4 \pm 0.5	33.1 \pm 0.7	20.3 \pm 0.6	19.4 \pm 0.6
6	24.1 \pm 0.7	32.4 \pm 0.7	25.3 \pm 25.3	28.8 \pm 0.5	29.8 \pm 0.2	32.7 \pm 0.6	21.4 \pm 0.4	19.1 \pm 0.3

Resultados

EXPRESIÓN GÉNICA



La presencia de β - glucano in larvas de 6 dpf larvas induce un nivel de expresión más alta que in larvas de 3 dpf.

El simple contacto de la molécula con las larvas en la solución permite la detección de efectos.

La expresión de genes observada es independiente de la dosis de β - glucano utilizado.

Se ha observado una alta variabilidad de los resultados dentro de los experimentos.

Los genes que se proponen como marcadores del sistema inmune son los siguientes: *TNF α* , *TLR22*, *LYZ* and *HSP70*

Los embriones de pez cebra son un método útil para el cribado rápido de moléculas funcionales.

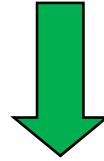
Larvas de 6 dpf son las más adecuadas para evaluar los efectos inmunoestimulantes de moléculas funcionales.

El método desarrollado en este proyecto puede ser utilizado para evaluar la eficacia de una variedad de moléculas funcionales.

3. Efecto inmunoestimulante de suplementos de piensos en acuicultura.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una Industria importante



Los peces están constantemente expuestos a una variedad de agentes potencialmente patógenos, condiciones ambientales adversas, etc.



Uso de vacuna y antibióticos



Uso de inmunoestimulantes para incrementar la resistencia de los peces a las infecciones.

3. Efecto inmunoestimulante de suplementos de pienso en acuicultura.

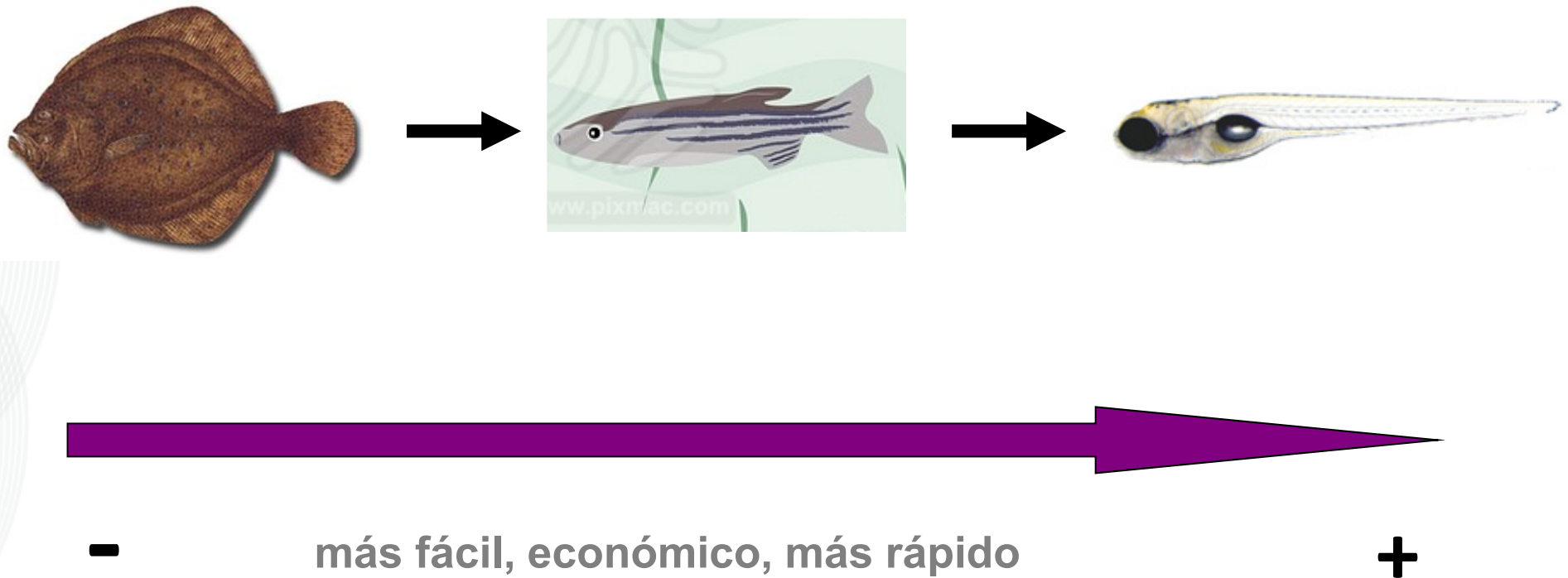
INTRODUCCIÓN

¿Podemos utilizar el pez cebra en sus estadios tempranos de desarrollo para evaluar los efectos inmunomoduladores de ingredientes de pienso para peces?



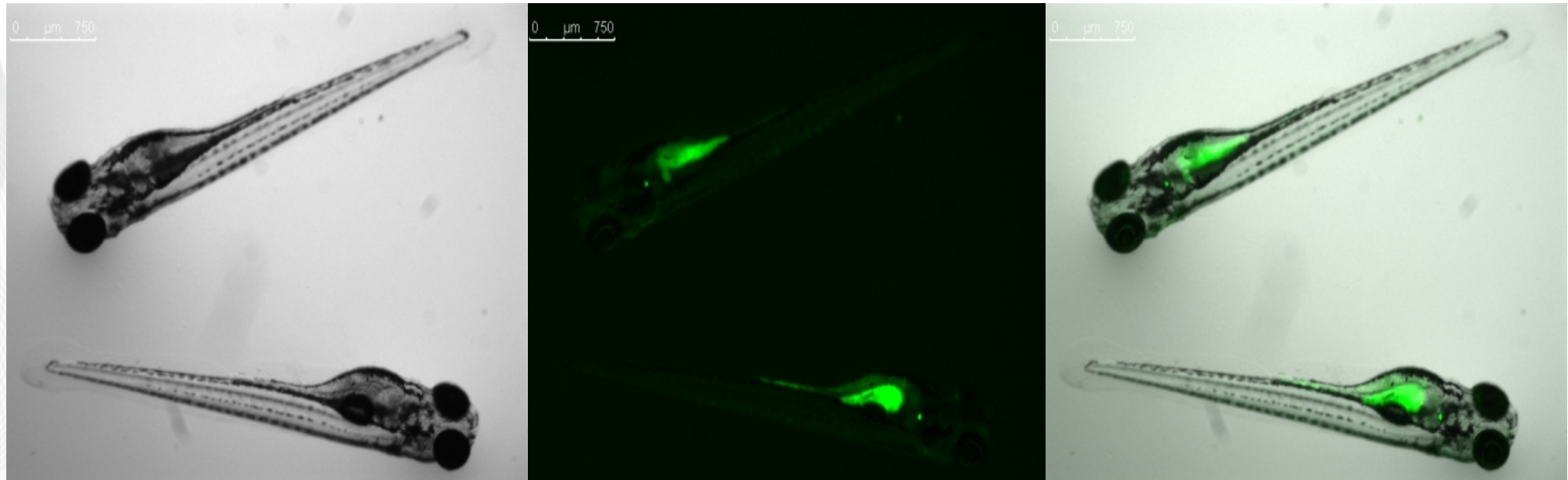
3. Efecto inmunoestimulante de suplementos de pienso en acuicultura.

INTRODUCCIÓN



1. ¿Entra el **β - glucano** dentro de las larvas por inmersión?
2. ¿Hay efectos del **β -glucano** sobre la mortalidad de las larvas in larvas tras:
 - 2.1 un estrés físico? (temperatura & UV)
 - 2.2 un estrés biológico? (*Vibrio anguillarum*)
3. ¿Hay cambios en la expresión de genes relacionados con el sistema inmune innato tras una exposición **β - glucano**? (RT-qPCR)

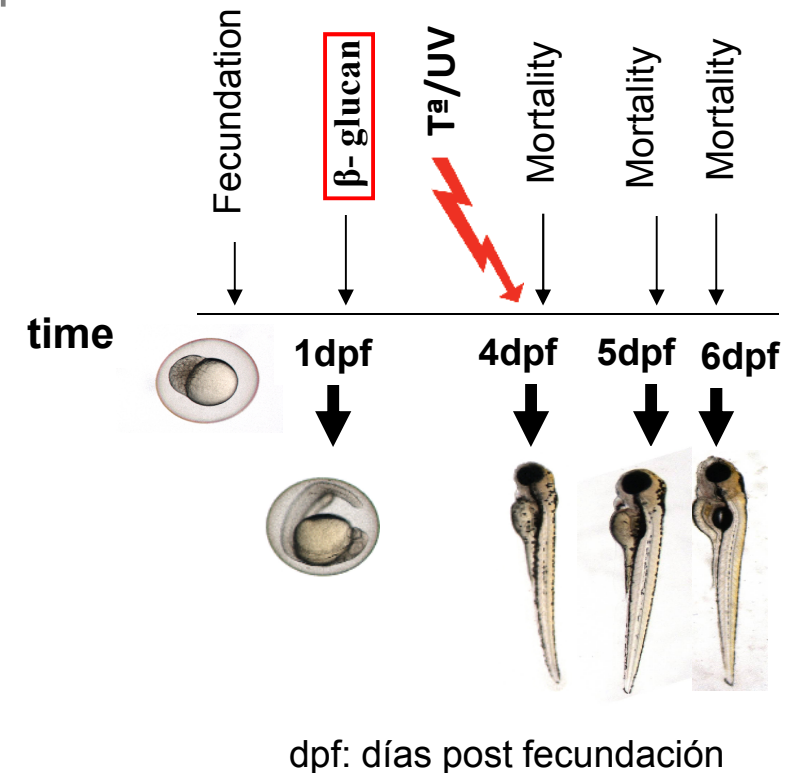
1. ¿Entra el β - glucano dentro de las larvas por inmersión?



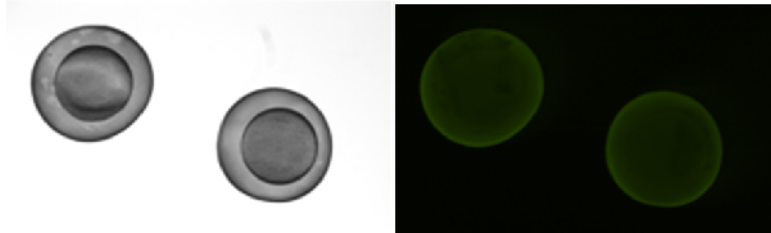
Larvas de 4 dpf expuesta a β -glucano marcado con fluorescencia durante 24h

- Cálculo del LD50 a diferentes estadios del desarrollo y a diferentes temperaturas y tiempos de exposición a UV.
- **Temperatura** (larvas de 4 dpf incubadas 1 h a 40°C)
- **UV** (larvas de 4 dpf expuestas a UV 1 min)

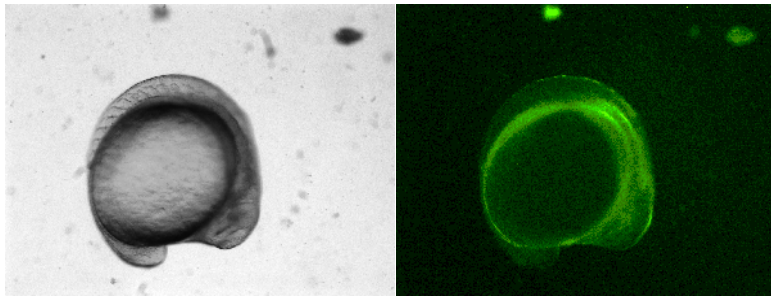
La exposición a β -glucano durante 3 días no mostró efecto en la mortalidad de las larvas tras la exposición a los estreses físicos testados.



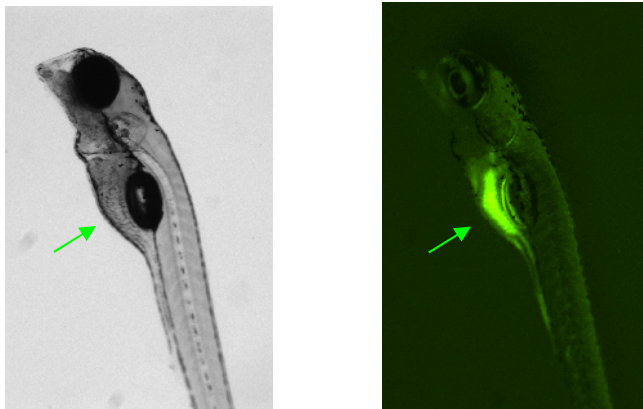
- ¿Entra *Vibrio anguillarum* dentro de embriones y larvas?
- ¿Es letal para las larvas si expuestas por inmersión?
- ¿En que punto del desarrollo tiene efecto?



← Embriones de 4hpf → 2h de exposición



← Embriones de 4hpf → 24h de exposición

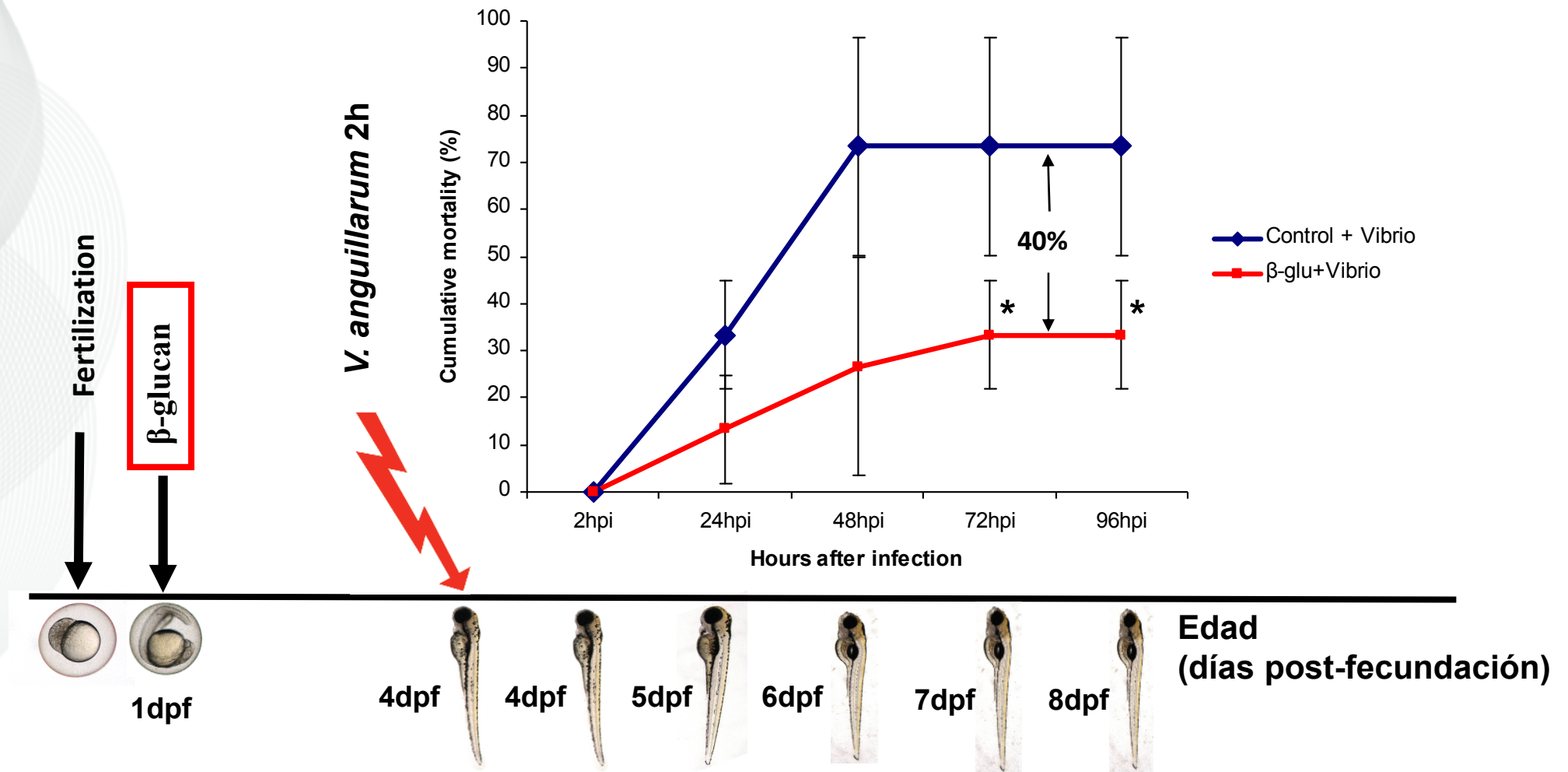


← Larvas de 4dpf → 2h de exposición

V. anguillarum marcado con GFP

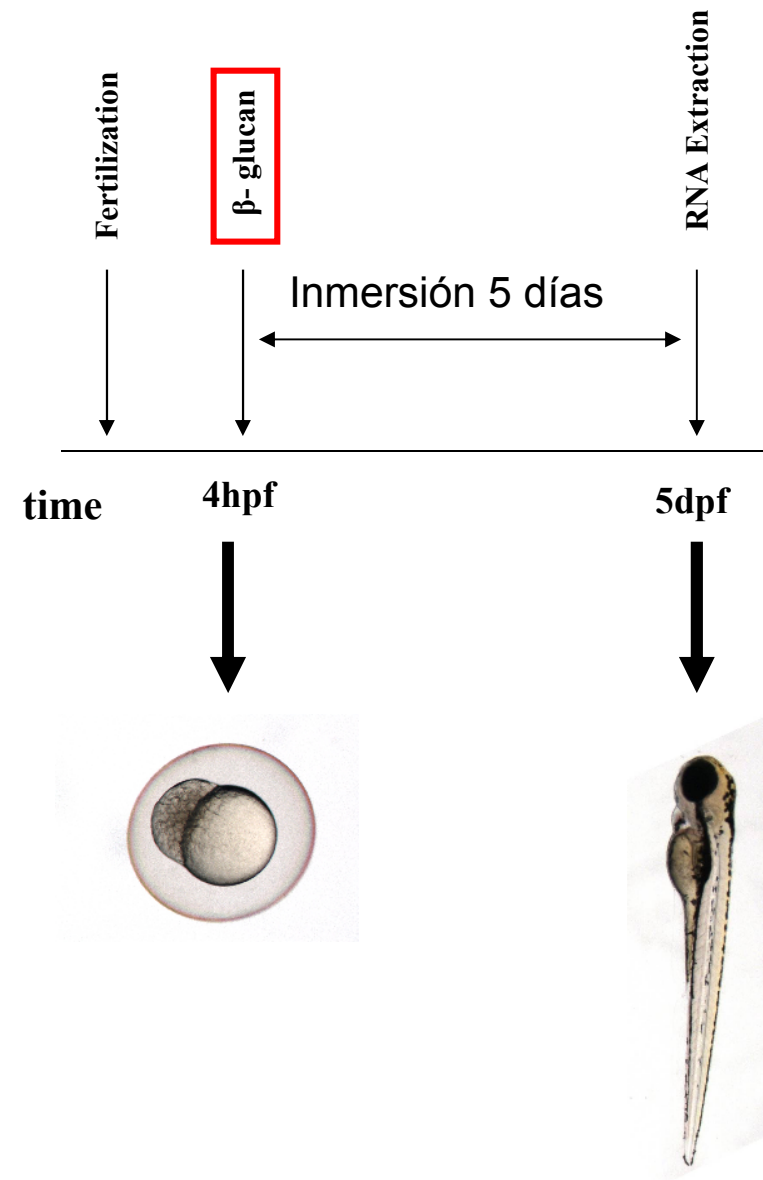
Resultados

Efectos del β - glucano en la mortalidad de las larvas tras exposición a *V. anguillarum* por inmersión ($p < 0.05$). Elevada variabilidad de resultados



Genes relacionados con el sistema inmune

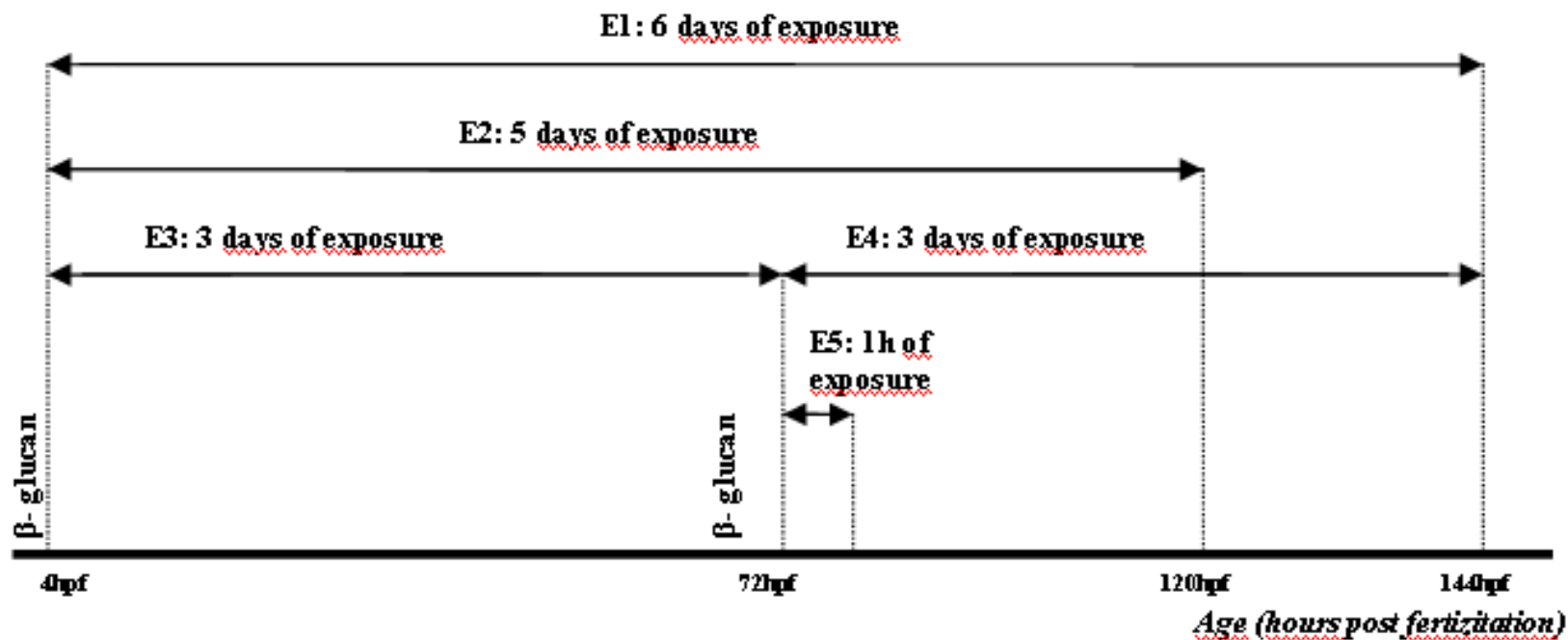
- ❑ **cytokines:** Interleukin 1 β (*IL-1 β*) y tumor necrosis factor α (*TNF α*)
- ❑ **toll like receptors:** *TLR22*
- ❑ **lytic enzymes:** lysozyme (*LYZ*)
- ❑ **mieloperoxidase** (*MPO*)
- ❑ **transferrin** (*TRF*)

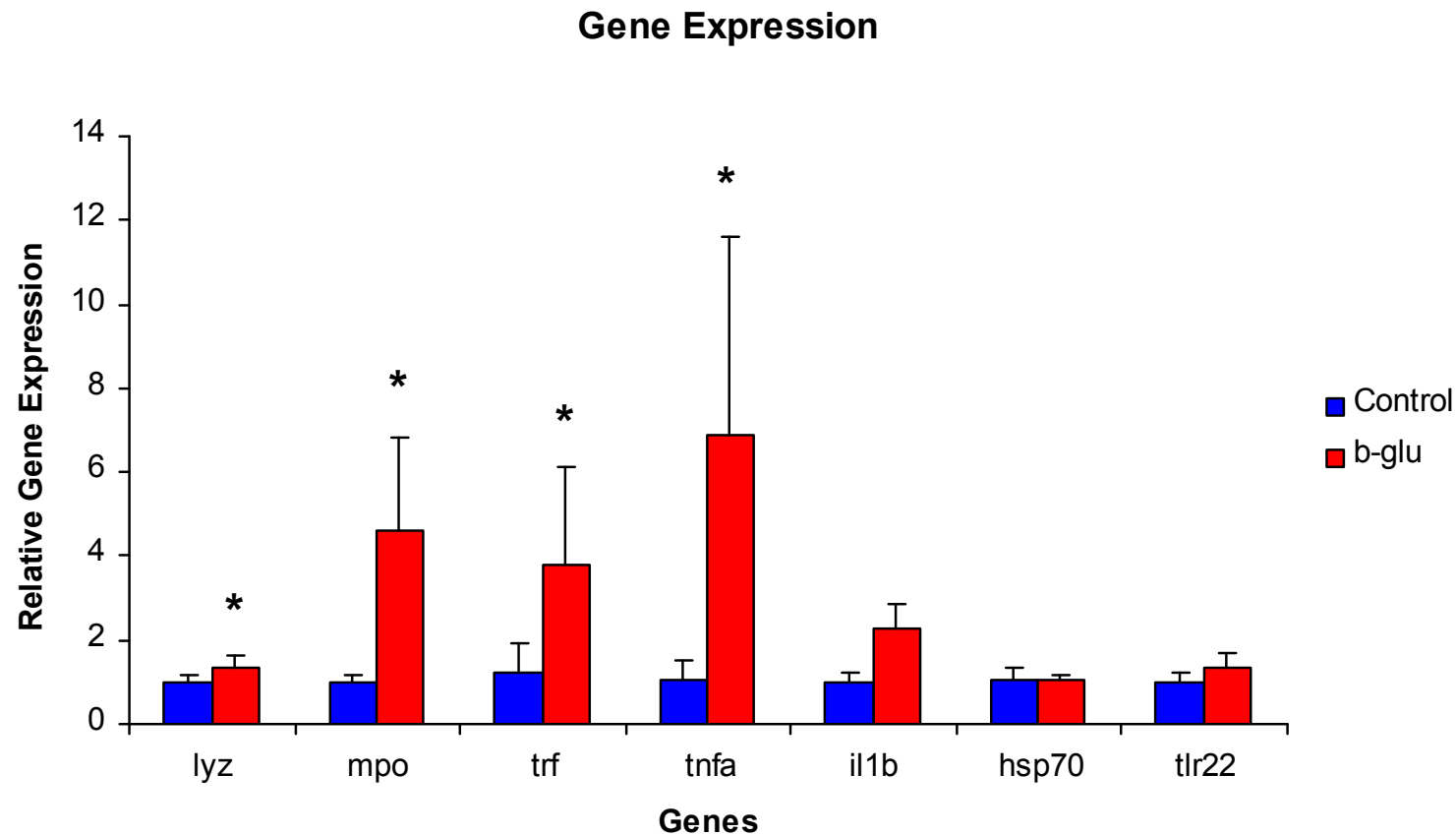




Optimización del test de inmunoestimulación (β -glucano)

Selección del tiempo de exposición





El simple contacto de la molécula con las larvas nos permitió detectar algunos efectos en algunos de los genes estudiados relacionados con el sistema inmune innato. ($p < 0.05$)

- Las larvas de pez cebra son un buen sistema alternativo para evaluar la efectividad de moléculas funcionales de interés para la dieta de peces.
- Los genes seleccionados pueden usarse como biomarcadores de la respuesta del sistema inmune innato para conocer las condiciones biológicas de los peces.
- El método puesto a punto puede utilizarse para testar la eficacia de una variedad de moléculas activas en ensayos **high-throughput**.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Oyarbide, U., Rainieri, S., Pardo, M.A. (2012) Zebrafish (*Danio rerio*) larvae as a system to test the efficacy of polysaccharides as immunostimulants. **Zebrafish** 9: XXX-XXX (In press)

Olasagasti, M., Gatti M.A., Capitani, F., Pardo M.A., Escuredo, K., Rainieri S. (2012) Toxic effects of colloidal nanosilver on zebrafish embryos and larvae: methodology optimization and insight into toxic mode of action. **Food and Chemical Toxicology** (Enviado)

ARTÍCULOS TÉCNICOS

Pardo, M.A., Rainieri. S. (2011) El uso del modelo animal pez cebrá para testar la efectividad de moléculas bioactivas. **Alimentación Equipos y Tecnología** 263: 18-21.

Olasagasti M., Pardo M.A., Escuredo K., Rainieri S. (2011) Evaluación de los efectos tóxicos de nanopartículas de plata mediante análisis transcripómico en pez cebrá. **Revista de Toxicología** 28: 35.

Toxicidad

Rainieri S., Olasagasti M., Oyarbide U., Pardo MA (2010) Effects of nanosilver exposure on zebrafish embryos and larvae. The zebrafish embryo model in toxicology and teratology, Karlsruhe (D), 2-3 September 2010. Oral presentation.

Olasagasti M, Gatti MA, Capitani F, Escuredo K, Rainieri S (2010) *Study of an exposure protocol to assess the toxic effect of colloidal nanosilver with zebrafish embryos*. Nanotoxicology 2010, Edinburgh (UK) 2-4 June 2010. Poster

Olasagasti M, Pardo MA, Escuredo K, Rainieri S (2009) *Toxicity evaluation of nanoparticles as emerging food ingredients using toxicogenomics approach in zebrafish embryos*. 1st meeting on Emerging Technologies in Zebrafish, Bilbao (E), 25-26 November 2009. Oral presentation

Rainieri S, Olasagasti M, Pardo MA, Oyarbide U, Escuredo K (2009) *Zebrafish as a toxicogenomic model system for testing the safety of new food ingredients*. EUROTOX2009, Dresden (D), 13-16 September 2009. Poster

Efectividad

Oyarbide U, Rainieri S, Pardo MA (2011) Zebrafish An immunostimulatory model in aquaculture. Aquaculture Europe 2011. Rhodes (Greece) 18-21 October, 2011. Oral Communication

Oyarbide U, Martinez de Ilarduya O, Rojo I, Rainieri S, Pardo MA (2011) Gene expression changes in zebrafish after *Listonella anguillarum* inoculation. Aquaculture Europe 2011. Rhodes (Greece) 18-21 October, 2011. Poster

Oyarbide U, Rainieri S, Pardo MA (2010) Zebrafish (*Danio rerio*): an alternative model to evaluate the effectiveness of immunostimulans in aquaculture. Aquaculture Europe 2010, Oporto (P) 5-8 October 2010. Oral presentation.

Oyarbide U, Rainieri S, Pardo MA (2009) *Zebrafish embryo test for evaluating the immunostimulant effect of new functional molecules as potential food ingredients*. 1st meeting on Emerging Technologies in Zebrafish, Bilbao (E), 25-26 November 2009. Oral presentation.



www.azti.es | www.alimentatec.com | www.itsasnet.com

T. +34 94 657 40 00

Txatxarramendi ugartea z/g
48395 Sukarrieta, Bizkaia

Herrera Kaia, Portualdea z/g
20110 Pasaia, Gipuzkoa

Astondo Bidea, Edificio 609
Parque Tecnológico de Bizkaia
48160 Derio, Bizkaia